

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

João Marcelo Peixoto Moreira

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS UTILIZANDO  
EXTRATO ANTIGÊNICO TOTAL DE VERME ADULTO (SWAP CARBONATO)  
PARA O DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM UMA  
POPULAÇÃO COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA**

Belo Horizonte - MG

2020

**João Marcelo Peixoto Moreira**

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS UTILIZANDO EXTRATO ANTIGÊNICO TOTAL DE VERME ADULTO (SWAP CARBONATO) PARA O DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM UMA POPULAÇÃO COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA**

Projeto de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Negrão-Corrêa

Belo Horizonte

2020

043

Moreira, João Marcelo Peixoto.

Padronização e validação de técnicas sorológicas utilizando extrato antigênico total de verme adulto (SWAP carbonato) para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em uma população com baixa carga parasitária [manuscrito] / João Marcelo Peixoto Moreira. – 2020.

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

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Negrão-Corrêa.

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

1. Parasitologia. 2. Schistosoma mansoni. 3. Testes Sorológicos. 4. Imunoglobulinas. 5. Carga Parasitária. I. Negrão-Corrêa, Deborah Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Parasitologia

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**João Marcelo Peixoto Moreira**

411/2020/09  
entrada  
1º/2018  
2018683378

Às **quatorze horas** do dia **19 de março do ano de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Padronização e validação de técnicas sorológicas utilizando extrato antigênico total de verme adulto (SWAP carbonato) para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em uma população com baixa carga parasitária”** área de concentração: **Imunoparasitologia**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, 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. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa	UFMG	Aprovado
Dr. Edward José de Oliveira	IRR/FIOCRUZ	Aprovado
Dra. Stefan Michael Geiger	UFMG	APROVADO

**Expedição do resultado final.**

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

Exigências	
Recomendações	As recomendações para versão final da dissertação foram apresentadas pelo membros durante a arguição.
Sugestões	

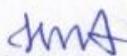
Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADO  
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.  
**Belo Horizonte, 19 de março de 2020.**

Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa \_\_\_\_\_  
(Orientadora)

Dr. Edward José de Oliveira \_\_\_\_\_

Dr. Stefan Michael Geiger \_\_\_\_\_

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

  
Prof. Héli da Monteiro de Andrada  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Parasitologia  
ICB-UFMG - Port:7104-04/10/2021  
SIAPE nº 2167747

Dedico este trabalho a minha orientadora e a  
mim

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os cientistas brasileiros, professores e estudantes que se mantêm na resistência pela continuidade da ciência no país, mesmo em momentos de grande crise.

Ao longo da minha trajetória como integrante do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG, desde o início da minha formação como estudante de graduação em Ciências Biológicas até estudante de mestrado, 7 anos se passaram e com isso muitas pessoas importantes me auxiliaram ao longo deste tempo.

Gostaria de agradecer as agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG, DECIT e PPSUS, pelo suporte financeiro, desde financiamento de projetos a concessões de bolsas.

Ao programa de Pós Graduação em Parasitologia, por todo o auxílio prestado, sempre que necessário. A todos os professores do programa que ministraram as disciplinas iniciais do mestrado, investindo ao máximo em nossa formação. Aos ex coordenadores do programa Ricardo Fujiwara e Daniela Bartolomeu, bem como os atuais coordenadores Daniela Bartolomeu e Hudson Alves pela disponibilidade de atendimento aos alunos, sempre auxiliando quando necessário. As secretárias da Pós Graduação Sibeles e Sumara, que estão sempre presentes, desde o início da jornada, sendo amigas, companheiras e confidentes, sempre auxiliando desde conselhos para as disciplinas às propostas de matrícula, sendo essenciais ao programa. A minha turma do mestrado de 2018, os “degringolados”, por toda a amizade e companheirismo ao longo do semestre e na viagem para Januária à união da turma foi de extrema importância.

Ao professor Dr. Stefan Michael Geiger, pela oportunidade de integrar o projeto DECIT e por muitos ensinamentos passados a mim, sempre que precisei procurá-lo. E aos alunos do seu laboratório, Paulo, Karine, Daiane e Vanessa por todo auxílio prestado.

Ao professor Dr. Ary Correa Jr, que ao longo dessa jornada, me passou inúmeros ensinamentos em diferentes áreas da biologia, desde como analisar uma lâmina de histologia até realizar a técnica de Western Blot, sempre estando disponível para me receber.

A toda equipe do laboratório de esquistossomose e suas diferentes gerações. Aos técnicos Zenir, Selma e José Carlos. A todos os alunos que tive a chance de conhecer, em diferentes fases do laboratório desde iniciações científicas a pós doutorandos, aos mais antigos Fernando, Paula, Izabella, Emília por ter sido uma grande amiga no meu início de iniciação

científica, Vanessa Fernandes, Vinicius, Michelle Rezende, Mariela Rezende, Samira Diniz, Cristiane Oliveira. Aos estudantes mais novos, Xeferson, Xênil, Guilherme, Gustavo e Caio. Ter conhecido estas pessoas foi uma experiência muito rica, pois as linhas de pesquisas são distintas, e tive a oportunidade de vivenciar um pouco cada uma delas, contribuindo para a minha formação enquanto parasitologista. A Dra. Elis Paula, adotada dos laboratórios da entomologia que se tornou integrante honorária da helmintologia. A Dra. Fernanda do Carmo Magalhães que iniciou no doutorado no estudo de sorologia juntamente comigo, quando eu era iniciação científica em 2015, trabalhando juntos na bancada desenvolvemos uma grande amizade, nos ajudando sempre que necessário, desde problemas pessoais a dificuldades ao longo da execução do projeto. Sendo ela, um grande pilar, que me auxiliou e auxilia a defender uma dissertação de mestrado. Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora, prof Dra. Deborah Negrão que me acolheu no seu laboratório duas vezes, a primeira no segundo período da graduação e a segunda no quinto período, após eu experimentar outras linhas de pesquisa, e constatar que o meu prazer estava na investigação parasito/ hospedeiro. Por ter me conferido grande liberdade no laboratório para participar de todas as linhas de pesquisa que eu pudesse e escolher qual eu gostaria de seguir com um projeto próprio. Por toda a paciência e dedicação depositada em mim ao longo deste tempo, estando o máximo possível disponível para me ajudar. Por ter no sentido literal, segurado a minha mão na bancada para me ensinar a fazer determinados experimentos, e que em alguns momentos acreditou mais em mim e no meu potencial do que eu mesmo e me dando forças para continuar.

Para finalizar, gostaria de agradecer a mim.

## **LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS**

Laboratório de Imunohelmintologia – ICB/UFMG

Profa. Dra. Deborah Negrão Corrêa

Laboratório de Helmintíases Intestinais – ICB/UFMG

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Laboratório de Infecções Fúngicas – ICB/UFMG

Prof. Dr. Ary Corrêa Jr

Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Profa. Dra. Mariangela Carneiro

Dra. Fernanda do Carmo Magalhães

## **APOIO FINANCEIRO**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

DECIT (Ministério da Saúde / CNPq, Nº 404405/2012-6)

Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS APQ-04237-17)

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível” (Francisco de Assis).

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante de grande impacto na saúde pública do Brasil, acometendo cerca de 2 milhões de pessoas, enquanto outras 25 milhões vivem em áreas de risco de adquirir a infecção. O diagnóstico laboratorial desta parasitose tem sido baseado na identificação de ovos nas fezes, principalmente através da técnica de Kato-Katz. Entretanto, dados demonstrados ao longo dos anos revelaram que indivíduos com baixa carga parasitária não são facilmente identificados pelo exame de fezes, sendo necessária a busca por formas mais sensíveis para o diagnóstico desta parasitose. Nesse contexto, alternativas moleculares e sorológicas têm sido estudadas com a finalidade de criar alternativas complementares que melhore a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, permitindo um controle mais efetivo da esquistossomose. A proposta do presente estudo foi avaliar a eficácia de teste imunoenzimático, utilizando o extrato antigênico total de verme adulto, anteriormente usado em testes de intradermoreação (SWAP-carbonato) e diferentes isotipos de IgG, como ferramenta auxiliar no diagnóstico da esquistossomose em pacientes com baixa carga parasitária de regiões endêmicas. Para tanto, foram utilizadas amostras de soro de residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo, município de Januária no Norte de Minas Gerais, área endêmica para esquistossomose. Estes residentes já haviam sido caracterizados parasitologicamente através do exame de 18 lâminas de Kato-Katz, 2 testes de Gradiente Salino, Helminex® e Sedimentação Espontânea no início do estudo e 12 meses após tratamento específico. Após a otimização das concentrações dos diferentes reagentes, a reatividade das subclasses IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) do soro dos participantes, frente aos antígenos presentes no SWAP-carbonato, foi testada e a acurácia diagnóstica foi avaliada em relação a referência de infecção ativa (presença de ovos em qualquer teste parasitológico). Identificação de proteínas reativas no SWAP-carbonato em soro de indivíduos com diferente status parasitológico foi verificado através de Western Blot. Os dados revelam que IgG1- e IgG4-anti SWAP-carbonato, mas não IgG3, foram significativamente elevadas em indivíduos com infecção ativa por *S. mansoni* em relação aos não infectados e tiveram melhor concordância com relação ao teste de referência ( $\kappa = 0.3$ ). A reatividade de IgG1 foi mais sensível (81,3%), sendo reativo em todos indivíduos com carga acima de 100 OPG e em 75 % dos infectados com menos que 12 OPG, mas o teste obteve baixa especificidade e a reatividade não reduziu significativamente nos indivíduos curados. Por outro lado, a reatividade de IgG4 foi menos sensível (60%), mas apresentou melhor especificidade (72%) e sua reatividade reduziu significativamente 1 ano após o tratamento. Além disto, a análise de western blot permitiu identificar um conjunto de proteínas de alto peso molecular (150-200 kDa) que foram especificamente reconhecidas por estas subclasses de anticorpos. Os dados indicam a possibilidade de obtenção de um teste sorológico baseado na reatividade de subclasses de IgG, que seja mais sensível para diagnóstico de indivíduos de com baixa carga parasitária, residentes em áreas endêmicas.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, diagnóstico sorológico, imunoglobulinas, baixa carga parasitária.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease of great impact on public health in Brazil, affecting about 2 million people, while another 25 million live in areas at risk of acquiring infection. The laboratory diagnosis of this parasitosis has been based on the identification of eggs in the feces, mainly through the Kato-Katz technique. However, recent data show that individuals with low parasitic load are not easily identified by examining feces, and it is necessary to search for more sensitive forms for the diagnosis of this parasitosis. In this context, molecular and serological alternatives have been studied in order to create complementary alternatives that improve the sensitivity of the diagnosis, allowing a more effective control of schistosomiasis. The purpose of the present study was to evaluate the efficacy of an immunoenzymatic test using the total antigenic extract of adult worm previously used in intradermal testing (SWAP-carbonate) and different IgG isotypes as an auxiliary tool in the diagnosis of schistosomiasis in patients with low parasitic load of endemic regions. For this purpose, serum samples were taken from residents of the rural community of Brejo do Amparo, municipality of Januária in the north of Minas Gerais, an endemic area for schistosomiasis, which had already been characterized parasitologically through the examination of 18 Kato-Katz slides, 2 Salt Gradient, Helmintex® and Spontaneous Sedimentation tests at the beginning of the study and 12 months after specific treatment. After optimizing the concentrations of the different reagents, the reactivity of the IgG subclasses (IgG1, IgG3 and IgG4) of the participants serum against the antigens present in the SWAP-carbonate was tested and the diagnostic accuracy was evaluated in relation to the active infection reference (presence eggs in any parasitological test). Identification of reactive proteins in SWAP-carbonate in serum from individuals with different parasitological status was verified using Western Blot. The data reveal that IgG1- and IgG4-anti SWAP-carbonate, but not IgG3, were significantly elevated in individuals with active infection by *S. mansoni* in relation to those not infected and had better agreement in relation to the reference test ( $\kappa = 0.3$ ). IgG1 reactivity was more sensitive (81.3%), being reactive in all individuals with a load above 100 OPG and in 75% of those infected with less than 12 OPG, but the test had low specificity and the reactivity did not significantly decrease in healed individuals. On the other hand, IgG4 reactivity was less sensitive (60%), but it had better specificity (72%) and this reactivity reduced significantly 1 year after treatment. In addition,

Western Blot analysis made it possible to identify a set of high molecular weight proteins (150-200 kDa) that were specifically recognized by these antibody subclasses. The data indicate the possibility of obtaining a serological test based on the reactivity of IgG subclasses, which is more sensitive for diagnosing individuals with low parasitic load living in endemic areas.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, serological diagnosis, immunoglobulins, low parasitic load.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil 1998-2008 (BRASIL, 2015). .....	24
Figura 2. Distribuição da esquistossomose pelo Ministério da Saúde, (2019).....	25
Figura 3. Desenvolvimento de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	28
Figura 4. Resposta imune induzida após a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	31
Figura 5. Localização geográfica do Estado de Minas Gerais no Brasil e localização da área endêmica no município de Januária, região norte de Minas Gerais. ....	51
Figura 6 Fluxograma demonstrando a coleta das amostras biológicas e sua utilização no estudo .....	53
Figura 7. Reatividade relativa de IgG1, IgG3 e IgG4 frente ao antígeno de verme adulto em indivíduos residentes em uma comunidade rural de Brejo do Amparo, Januária – MG.....	64
Figura 8. Análise da reatividade relativa de subclasses de IgG1, IgG3 e IgG4, frente a diferentes cargas parasitárias encontradas na comunidade rural de Brejo do Amparo, distrito de Januária (MG). ....	69
Figura 9. Análise de correlação e regressão linear entre reatividade relativa das subclasses de IgG1, IgG3 e IgG4 de indivíduos positivos parasitologicamente frente a carga parasitária.....	71
Figura 10. Evolução da resposta humoral das subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 em indivíduos tratados e curados por um ano.....	74
Figura 11. Verificação do perfil eletroforético do extrato antigênico SWAP-carbonato em gel de poliacriladima 10% .....	75
Figura 12. Identificação das principais proteínas do antígeno SWAP-carbonato de reconhecimento frente à subclasse IgG1 .....	77
Figura 13. Identificação das principais proteínas do antígeno SWAP-carbonato (1mg) de reconhecimento frente à subclasse IgG4 .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Relação dos pools de soros escolhidos para a verificação da reatividade contra o antígeno SWAP .....	58
Tabela 2 Prevalência de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> e de helmintoses intestinais em residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo, no município de Januária, Minas Gerais, Brasil .....	61
Tabela 3 Desempenho da técnica de ELISA para detecção de IgG1 reativa a antígenos de <i>S. mansoni</i> em comparação com o “teste referência” .....	65
Tabela 4 Desempenho da técnica de ELISA para detecção de IgG3 reativa ao antígeno de <i>S. mansoni</i> em comparação com o “teste referência ” .....	66
Tabela 5 Desempenho da técnica de ELISA para detecção de IgG4 reativa ao antígeno de <i>S. mansoni</i> em comparação com o “teste referência” .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

POC-CCA – *Point of Care* (Teste rápido de urina)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

ELISA – *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

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

SWAP – *Soluble Worm Adult Preparation* (Antígeno solúvel de verme adulto)

CCA – *Circulating Cathodic Antigen* (Antígeno Catódico Circulante)

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Soro Albumina Bovina)

WHO – *World Health Organization*

OMS – Organização Mundial da Saúde

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OPG – Ovos Por Grama de fezes

PCE – Programa de Controle da Esquistossomose

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PECE – Programa Especial de Controle da Esquistossomose

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Epidemiologia da doença .....	22
2.2 Ciclo Biológico .....	27
2.3 Resposta Imune e Alterações Clínicas.....	28
2.4 Controle da esquistossomose .....	33
3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	37
3.1. Métodos Parasitológicos.....	37
3.2. Métodos Moleculares .....	40
3.3. Métodos imunológicos.....	40
4. Justificativa.....	48
5. Objetivo.....	49
5.1. Objetivo Geral .....	49
5.1.1 Objetivos específicos.....	49
6. METODOLOGIA .....	50
6.1. Área de Estudo .....	50
6.2. População do estudo.....	50
6.3. Coletas e processamento das amostras.....	51
6.4. Extrato antigênico de <i>S. mansoni</i> .....	53
6.5. Ensaio Imunoenzimático de ELISA.....	54
6.6. Perfil eletroforético do antígeno SWAP carbonato (eletroforese) .....	55
6.7. Westen Blot.....	56
6.8. Análise Estatística.....	58
7. RESULTADOS .....	60
7.1. Caracterização da população de estudo .....	60
7.2. Reatividade de IgG1, IgG3 e IgG4 ao antígeno SWAP carbonato no soro dos indivíduos da população de estudo.....	61
7.3. Reatividade de subclasses de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) a SWAP-carbonato em indivíduos infectados e curados. ....	72
7.4. Análise do perfil eletroforético do extrato antigênico total de verme adulto de <i>S. mansoni</i> extraído em tampão carbonato .....	74
7.5. Avaliação das bandas reativas específicas para o diagnóstico de <i>S. mansoni</i> .....	75

8. DISCUSSÃO.....	79
9. CONCLUSÃO .....	85
10. BIBLIOGRAFIA.....	86
10. ANEXO .....	96
10.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo encontram-se infectadas por pelo menos uma espécie de helminto, onde a maioria dos indivíduos infectados residem em áreas subdesenvolvidas da África, Ásia e Américas (HOTEZ *et al.*, 2008). Entre as helmintoses de maior impacto na saúde humana destaca-se a esquistossomose, doença crônica e debilitante causada pela infecção por uma das cinco espécies do gênero *Schistosoma*: *S. hematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi* (CHUAH *et al.*, 2019). Estima-se que a esquistossomose afeta cerca de 220 milhões de pessoas que vivem em áreas tropicais e subtropicais de 78 países na África, América e Ásia (GRYSEELS *et al.*, 2012; COLLEY *et al.*, 2014; WHO, 2017).

No Brasil, a esquistossomose humana é causada exclusivamente pela infecção por *S. mansoni*, sendo estimado que 1,5 milhões de brasileiros estejam infectados pelo parasito (KATZ, 2018). As principais áreas endêmicas estão localizadas no litoral Nordeste e nos estados da Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo, enquanto que nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, em áreas das regiões Norte e Sul do país a transmissão da esquistossomose possui caráter focal e disperso (COLLEY *et al.*, 2014; ZONI *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2018). Os estados da Bahia e Minas Gerais caracterizavam-se inicialmente por altas prevalências de infecção e indivíduos infectados possuindo altas ou moderadas cargas parasitárias. Atualmente, estas e outras áreas endêmicas, sofreram grandes modificações no perfil de transmissão da esquistossomose em consequência de medidas de melhorias de estrutura sanitária, atendimento médico em áreas endêmicas e educação em saúde. Outro fator primordial para essa mudança se deve a atuação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) realizado em áreas endêmicas, cujos principais pilares são o diagnóstico e o tratamento dos indivíduos infectados. Esta estratégia de controle tem sido associada à redução da carga parasitária nos indivíduos positivos para *S. mansoni*, ocasionando a redução dos casos mais graves de hepatoesplenomegalia, entretanto não possui efeito protetor contra reinfecções, permitindo a expansão da esquistossomose pelo país (SAVIOLI *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2016; ROSS *et al.*, 2016; KATZ, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2019; SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

*S. mansoni* é o agente etiológico causador da esquistossomose mansoni, cujas formas intermediárias desenvolvem-se em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*, através de sucessivas gerações de reprodução assexuada de esporocistos (WOLMARANS *et al.*, 2002). As formas adultas do parasito habitam e se reproduzem nos vasos mesentéricos dos hospedeiros definitivos, que incluem algumas espécies de mamíferos, sendo o homem o hospedeiro de maior importância epidemiológica (COLLEY *et al.*, 2014). Na maioria dos casos, a infecção por *S. mansoni* se apresenta de forma assintomática ou com sintomas leves e inespecíficos; entretanto, parte dos indivíduos infectados podem evoluir para formas clínicas extremamente graves que pode levar o paciente a óbito (COLLEY *et al.*, 2014). Durante as primeiras semanas de infecção, período de migração sistêmica de esquistossômulos e amadurecimento de vermes adultos, período denominado de fase aguda pré-postural da esquistossomose, alguns indivíduos podem apresentar sintomas inflamatórios graves que caracterizam os quadros conhecidos como fase toxêmica da esquistossomose ou febre de Katayama, (NEVES, 2005; ROSS *et al.*, 2007). Entre a 5 e 6ª semana de infecção, as fêmeas iniciam a postura dos ovos nas veias mesentéricas, sendo que somente 40-50 % dos ovos produzidos pelo parasito são eliminados juntamente com o bolo fecal e o restante permanece retido nos tecidos do hospedeiro, especialmente fígado e intestino (BOROS & WARREN, 1970; CHEEVER *et al.*, 1999). Os ovos retidos nos tecidos do hospedeiro induzem uma intensa resposta imunológica, que está associada às principais alterações clínicas detectadas na fase crônica da esquistossomose. Nesta fase é possível apresentar fortes sintomas na região abdominal devido a migração e ao granuloma formado ao redor dos ovos na mucosa intestinal que pode ocasionar na formação de microulcerações e sangramento superficial (ROSS *et al.* 2002). Os indivíduos não tratados, dependendo de fatores como carga parasitária, tipo e intensidade da resposta imune, podem evoluir para a forma hepatoesplênica da esquistossomose, caracterizada por deposição de um grande número de ovos nos tecidos, especialmente na região peri-portal do fígado, induzindo um intenso processo inflamatório, responsável por lesões destrutivas e obstrutivas do sistema porta-hepático (LAMBERTUCCI *et al.*, 2004; COLLEY *et al.*, 2014; MCMANUS *et al.*, 2018).

Por apresentar alta especificidade, baixo custo e facilidade operacional, o exame coproscópico pela técnica de Kato-Katz que detecta ovos do parasito nas fezes é o

método recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni (WHO, 1994). A técnica de Kato-Katz é eficiente na detecção de infecções moderadas e intensas; entretanto, indivíduos com baixas cargas parasitárias não são facilmente identificados por este método (DE VLAS & GRYSEELS, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Neste novo cenário epidemiológico, o diagnóstico parasitológico baseado no exame de fezes utilizando a técnica de Kato-Katz, como recomendado pela OMS, não tem se mostrado sensível para identificar todos os indivíduos infectados, colocando em risco a estratégia de controle da esquistossomose no Brasil, sendo necessário o desenvolvimento e utilização de ferramentas complementares de diagnóstico (KATZ, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

Entre as alternativas disponíveis, estudos que utilizam técnicas moleculares para o diagnóstico da esquistossomose mansoni relatam diferenças de acurácia em função do alvo utilizado, também sendo verificado que a técnica possui maior acurácia diagnóstica quando realizada utilizando fezes (PONTES *et al.*, 2003; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014; WEERAKOON *et al.*, 2018; FUSS *et al.*, 2018). Dentre as sequências testadas, destaca-se uma que possui grande acurácia em testes realizados no Brasil utilizando primer forward 5'-CCG ACC AAC CGT TCT ATG A-3 e reverse CAC GC TCT CGC AAA TAA TCT AAA-3 (PONTES *et al.*, 2003), entretanto, apesar de bons resultados, os testes moleculares são de custo mais elevado e demandam infraestrutura mais sofisticadas em relação a outras técnicas.

Ensaio sorológicos que utilizam a detecção de anticorpos específicos contra antígenos de *S. mansoni* têm se mostrado alternativas sensíveis para identificar indivíduos infectados com baixa carga parasitária. Entretanto, muitos estudos indicam que o uso da sorologia como alternativa diagnóstica apresenta importantes limitações, já que a resposta humoral pode permanecer elevada por longo período após a cura parasitológica e a possibilidade de ocorrer reação cruzada com outras espécies de helmintos (RABELO *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2012; HINZ *et al.*, 2017; FUSS *et al.*, 2018). É importante salientar que a maioria dos estudos sorológicos foram realizados em comparação com resultados parasitológicos obtidos com a realização de poucas lâminas de Kato Katz, que demonstrou baixa sensibilidade para o diagnóstico de indivíduos que apresentam baixas cargas parasitárias (SIQUEIRA *et al.*, 2011; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Na tentativa de minimizar as limitações dos testes sorológicos, alguns estudos utilizam testes que detectam antígenos excretados/secretados pelos parasitos, como a detecção de antígeno catódico circulante e antígeno anódico circulante, CCA e CAA respectivamente, que são mais específicos e rapidamente eliminados da circulação após a cura parasitológica. Os resultados promissores, obtidos com a detecção do antígeno CCA, estimularam o desenvolvimento de um teste rápido para ser aplicado com amostras de urina, designado de (*Point of care*) POC-CCA, que apresentou boa acurácia diagnóstica quando realizados em áreas de cargas moderada/altas (CHERNET *et al.*, 2017; FUSS *et al.*, 2018); entretanto, sua performance para detecção de infectados em áreas de baixa carga parasitária não tem sido satisfatória (COELHO *et al.*, 2016; LINDHOLZ *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2019).

Diante do exposto, faz-se necessário a padronização e validação de metodologias complementares e mais sensíveis de diagnóstico para esquistossomose, que tenham aplicabilidade para uso em campo e que possam ser utilizadas em áreas endêmicas onde os indivíduos apresentam baixa carga, como tem sido observado em várias áreas endêmicas no Brasil. Para tanto, a população em estudo precisa ser muito bem caracterizada em relação ao *status* parasitológico para que as alternativas diagnósticas possam ser mais bem avaliadas. No presente estudo, foi avaliado a reatividade de diferentes subclasses de IgG frente à antígenos do extrato total de verme adulto de *S. mansoni* anteriormente utilizado em técnicas de intradermoreação (SWAP-carbonato). O teste foi realizado em residentes em Brejo do Amparo distrito de Januária, Norte de Minas Gerais, que foram anteriormente examinados por uma combinação de técnicas parasitológicas, incluindo Gradiente Salino, Helmintex e múltiplas lâminas de Kato-Katz. O uso da combinação de testes parasitológicos propiciou a identificação específica de indivíduos infectados com baixa carga, permitindo uma melhor avaliação da eficácia de outras estratégias de diagnóstico para identificar indivíduos infectados por *S. mansoni*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia da doença

Dados recentes mostram que a esquistossomose possui ampla distribuição geográfica, acometendo aproximadamente 78 países, especialmente nos continentes Africano, Asiático e Sul-Americano. Após todos os esforços realizados para controle da esquistossomose, estima-se que cerca de 220 milhões de pessoas estejam infectadas (WHO, 2017), enquanto 779 milhões encontram-se sob o risco de contrair a infecção no mundo. Baseado nos dados do *Global Burden Diseases* de 2017, a morbidade associada à esquistossomose foi responsável por 1,431 milhão (95% da IU 876,58 - 2,436) de anos perdidos por incapacidade ou morte prematura (DALYs) (IHME, 2018). A África possui a maioria dos casos relatados de esquistossomose no mundo, possuindo duas espécies mais prevalentes: *S. haematobium* causador da esquistossomose vesical e *S. mansoni*, a principal espécie responsável pela esquistossomose intestinal. Para *S. haematobium*, estima-se 436 milhões de indivíduos residindo em áreas de risco e 112 milhões de infectados. Enquanto que *S. mansoni* possui uma estimativa de 393 milhões de indivíduos com risco de infecção e 54 milhões de infectados. (WHO, 2016; FRENCH *et al.*, 2018).

Nas Américas a única espécie prevalente é *S. mansoni*, sendo endêmica no Brasil, Caribe, Suriname e Venezuela, onde foi estimado cerca de 6,3 milhões de pessoas infectadas, sendo a maioria residentes no Brasil. (WHO, 2016). No Brasil, foram realizados três inquéritos epidemiológicos de abrangência nacional tendo como foco de estudos crianças em idade escolar. O primeiro inquérito foi coordenado por Pellon e Teixeira e executado pela Divisão de Organização Sanitária do Ministério de Educação e Saúde, no período de 1947 a 1952 e teve como objetivo estimar a prevalência de esquistossomose e geo-helmintoses. A primeira parte do estudo foi publicada em 1950, abrangendo os Estados do Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, que são as áreas de maior transmissão para a esquistossomose. Foram avaliados 440.786 escolares (7-14 anos) de 877 localidades e a prevalência estimada de infecção por *S. mansoni* foi de 10%. A segunda etapa do levantamento foi publicada em 1953, compreendendo os Estados de Goiás, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Nestes Estados foram examinados 174.192 estudantes, de 313 localidades,

sendo encontrado uma prevalência de 0,08% para esquistossomose (PELLON & TEIXEIRA, 1950, 1953).

Posteriormente, entre 1977-1981, logo após a implementação Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAM, do Ministério da Saúde, produziu o segundo levantamento nacional de prevalência da esquistossomose. Este levantamento também foi realizado em escolares e utilizou o exame quantitativo de fezes pela técnica de Kato-Katz, como ferramenta de diagnóstico. Neste estudo foram avaliados 447.768 escolares, sendo reportado 30.068 exames positivos, que representou uma prevalência estimada de 6,7% de brasileiros infectados por *S. mansoni*. O levantamento não incluiu escolares do Distrito Federal e dos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Rondônia Roraima e São Paulo (revisto por KATZ, 2018). Posteriormente, KATZ e PEIXOTO (2000) realizaram uma análise crítica dos dados notificados de Esquistossomose da Fundação Nacional de Saúde (FNS) juntamente com dados populacionais obtidos pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para os anos de 1996 e 1997. Neste período, o PCE realizou 4.008.290 exames fecais para 18 estados da federação e considerando-se a taxa de prevalência encontrada e os dados populacionais das áreas foi possível estimar que 7,4-8,3 milhões de brasileiros estavam infectados por *S. mansoni* neste período, sendo a distribuição da infecção semelhante à ilustrada na figura 1.

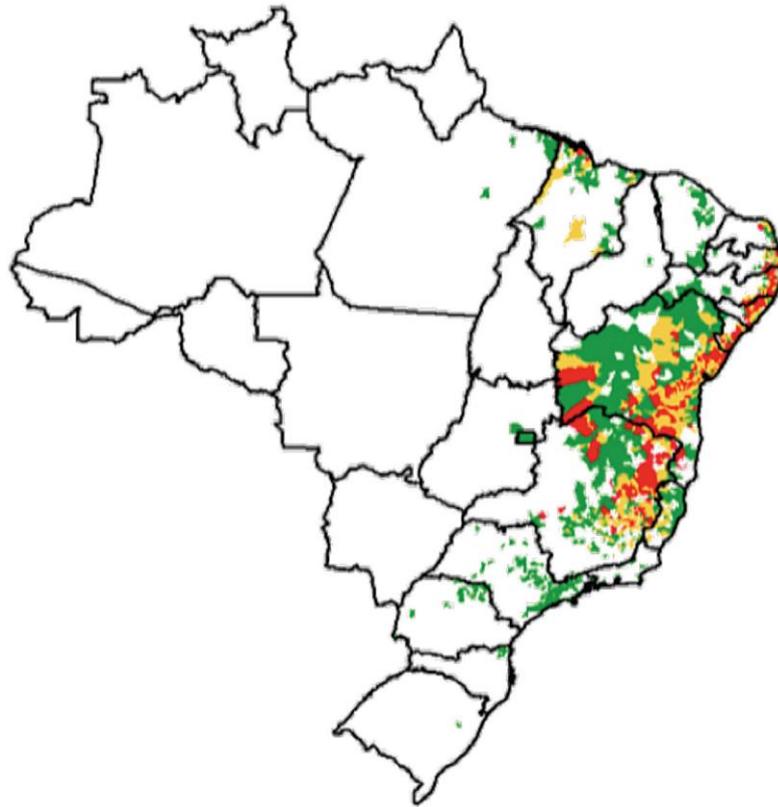


Figura 1. Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos 1998-2008 (BRASIL, 2015).

Em 2007, pouco antes do início do mais recente Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-helmintoses (INPEG), a Organização Mundial da Saúde estimou 2,5 milhões de infectados por *S. mansoni* no Brasil (WHO, 2007). O INPEG ocorreu de 2010-2015, sendo avaliados 197.564 escolares com idade entre 7-17 anos, amostrados de 521 municípios nos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. Os dados apresentados revelaram que 1,79% da população de área endêmica testada se encontravam infectados por *S. mansoni*. Em municípios com menos de 500.000 habitantes localizados em áreas endêmicas, o inquérito revelou uma proporção de 3,28% de positivos, com destaque para municípios dos estados do Alagoas (3,35%), Bahia (2,91%), Espírito Santo (1,02%), Minas Gerais (5,81%), Pernambuco (3,77%) e Sergipe (10,67%). Os dados para áreas não endêmicas indicam uma prevalência estimada de 0,13% para esquistossomose. Em municípios com menos de 500.000 habitantes de áreas não endêmicas foram detectados 0,05% de infectados, e para área endêmica 0,27%. As macrorregiões que apresentaram as maiores taxas de positividade foram o Nordeste e Sudeste, com 1,27% e 2,35% de prevalência de

esquistossomose, respectivamente, demonstrando uma redução da prevalência da doença no Brasil. Na região Norte, a taxa de positividade foi de 0,01%, no Centro-Oeste de 0,02% e na região Sul a infecção pelo parasito não foi detectada no estudo. As positivities nos demais estados obteve uma proporção menor que 0,5% figura 2 (KATZ, 2018).

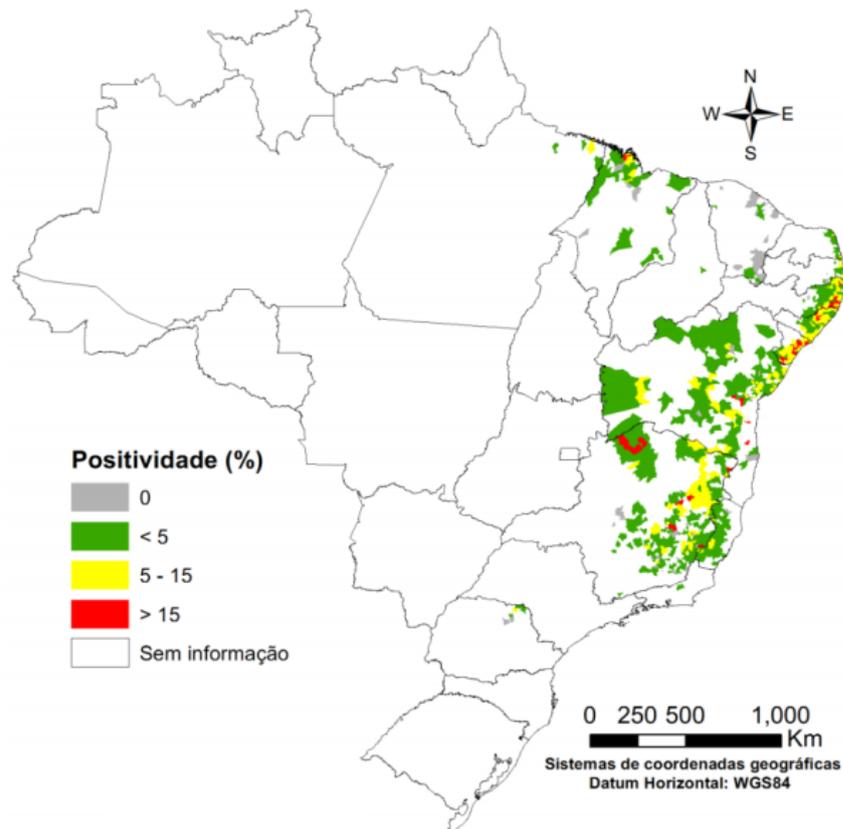


Figura 2. Distribuição da esquistossomose pelo Ministério da Saúde, (2019).

Apesar da redução do número de infectados e de casos graves de esquistossomose no Brasil, esta helmintose ainda é responsável por uma taxa de mortalidade de 0,4 para cada 100.000 habitantes, e a morbidade associada à esquistossomose no país foi estimada em 102,259 DALYs por 100.000 habitantes (95% UI 59,76-176,12), sendo relatada como a segunda causa de morbidade entre as doenças negligenciadas no ano de 2016 (KATZ, 2018; MARTINS-MELO *et al.*, 2018). Também é importante salientar que os últimos inquéritos nacionais utilizaram a técnica coproparasitológica de Kato-Katz para identificar a infecção, e esta metodologia é pouco sensível para diagnosticar indivíduos com baixas cargas parasitárias, considerando-os como falsos negativos, e isto pode subestimar a real

prevalência da esquistossomose e resultar em não tratamento de indivíduos infectados. (KATZ, 2018).

## 2.2. Ciclo Biológico

A espécie *S. mansoni* possui um ciclo heteroxênico, tendo como hospedeiro intermediário caramujos do gênero *Biomphalaria* e como hospedeiro definitivo o homem e algumas espécies de roedores silvestres, bovinos e primatas não humanos, sendo o homem o hospedeiro definitivo de maior importância epidemiológica figura 3 (COLLEY *et al.*, 2014). Ovos de *S. mansoni* eliminados juntamente com as fezes dos hospedeiros infectados são carregados a recursos hídricos, onde eclode uma larva ciliada denominada miracídio, que pode encontrar um caramujo susceptível. O miracídio penetra ativamente pelo tegumento de caramujos susceptíveis do gênero *Biomphalaria*, iniciando o processo de infecção. No Brasil, as espécies de *Biomphalaria* que já foram encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni* são *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. glabrata*, sendo esta última a mais susceptível (PARAENSE, 2001; SCHOTLITE *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2018). Após a penetração da larva ciliada no hospedeiro intermediário, o parasito perde os cílios diferenciando-se em esporocistos, que sofrem sucessivos ciclos de reprodução assexuada até a formação das cercarias. As cercarias saem ativamente para o ambiente externo, estimuladas por temperatura e luminosidade, e podem penetrar ativamente através da pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado, quando o mesmo entra em contato com cursos hídricos contaminados (BOEGA *et al.*, 1996; WOLMARANS *et al.*, 2002). Durante a infecção do hospedeiro definitivo, as cercarias perdem suas caudas e diferenciam-se em esquistossômulos, processo que ainda hoje não bem elucidado (GORDON & GRIFFITHS, 1951; CURWEN & WILSON, 2003; WHITFIELD *et al.*, 2003). Os esquistossômulos migram passivamente através da circulação sanguínea do hospedeiro, passam pelos pulmões e coração até se estabelecerem no sistema porta hepático entre o sétimo e décimo primeiro dia (LENZI *et al.*, 2008). Aproximadamente após 27 dias de infecção, os esquistossômulos transformaram-se em vermes adultos machos e fêmeas, que acasalam no sistema porta hepático e migram para veias mesentéricas. As fêmeas fecundadas realizam a postura dos ovos, especialmente nos ramos inferiores das veias mesentéricas, onde a fêmea produz em média 300 a 400 por dia (BRENER, 1956; VALADARES *et al.*, 1981; GRYSEELS, 2012). Dos ovos produzidos, aproximadamente 60% são carregados pela circulação sanguínea e acumulam-se principalmente no fígado ou ficam retidos no intestino durante o processo de eliminação, sendo alvos do sistema imunológico



isotipos de imunoglobulina responsáveis pela opsonização e fagocitose de antígenos (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; DE JESUS *et al.*, 2002; PEARCE & MACDONALD 2002). Durante esse período, o hospedeiro pode inicialmente apresentar um quadro de dermatite cercariana em casos de reinfecções, caracterizando-se como uma reação de hipersensibilidade induzida pela penetração da cercaria, levando a erupções micropapulares eritematosas e discretamente edemaciadas. Durante a migração dos esquistossômulos e amadurecimentos dos vermes adultos, podem aparecer sintomas inflamatórios sistêmicos como um quadro febril, calafrios, sudorese, fadiga, mialgia e cefaleia. Com o início da deposição de ovos, fase aguda pós-postural, também podem ser verificados sintomas como náuseas, vômitos, disenteria com numerosas evacuações e eosinofilia aumentada com placas de infiltrados que são visíveis em radiografias pulmonares (HIATT *et al.*, 1979; ROSS *et al.*, 2002).

Após o início da postura dos ovos, ocorre a produção de IL-4 e IL-5, que juntamente ao aumento progressivo de IL-10, resulta na modulação da resposta imune Th1 inicial e indução de uma resposta predominantemente Th2 (GRZYCH *et al.*, 1991; LAYLAND *et al.*, 2007), responsável pela produção e ativação de eosinófilos, basófilos, mastócitos e pela estimulação da produção de altos níveis de IgE circulantes como demonstrado na figura 4 (MALAQUIAS *et al.*, 1997; ANTHONY *et al.*, 2007; DUNNE e COOK, 2009). A retenção dos ovos de *S. mansoni* nos tecidos do hospedeiro é apontada como principal estímulo para indução da resposta Th2 (GRZYCH *et al.*, 1991), sendo que algumas proteínas excreto-secretadas pelo ovo, como omêga-1, IPSE, e peroxiredoxina, são de extrema importância no processo da polarização para resposta imune do tipo-2 (EVERTS *et al.*, 2009; STEINFELDER *et al.*, 2009). Em resposta a secreção dos antígenos produzidos pelos ovos de *S. mansoni* ocorre à ativação de células imunes teciduais, que juntamente com 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, que está associada à contenção de antígenos lesivos ao tecido do hospedeiro, mas também à evolução dos quadros de fibrose (BOROS, 1994; CHEEVER *et al.* 2000; PEARCE & MCDONNALD, 2002; DUNNE e COOKE, 2005; ANDRADE, 2008; COLEY & SECOR, 2014). Nesta etapa são relatadas fortes dores na região abdominal em resposta à migração e ao granuloma formado ao redor dos ovos na mucosa

intestinal podendo resultar na formação de microulcerações e sangramento superficial (ROSS *et al.* 2002). Por outro lado, a indução da resposta do tipo 2 pelos antígenos dos ovos de *S. mansoni* estimula mecanismos responsáveis pela remodelação tecidual e também tem efeito modulador sobre a inflamação mediada pela elevação de citocinas pró-inflamatórias dos perfis Th1 ou Th17, que predominam no início da infecção e geralmente ocasionam maiores danos teciduais (CHEN *et al.*, 2012; MEDZHITOV *et al.*, 2012; GAUSE *et al.*, 2013).

Altas cargas parasitárias e a ocorrências de reinfecções estão entre as principais causas de evolução para forma grave (ANDRADE, 2008), entretanto outros fatores são determinantes nesta evolução, como fatores genéticos e imunológicos (DUNNE & PEARCE, 1999). A infecção também induz aumento progressivo de mecanismos regulatórios, a maioria mediado pelo aumento da produção de IL-10, que é responsável pela modulação da resposta imune em pacientes crônicos, auxiliando no controle da morbidade. A presença desta interleucina pode induzir o desenvolvimento da população de células T regulatórias e suprimir respostas inflamatórias, tanto as respostas imunes Th1 quanto Th2, diminuindo a intensidade da inflamação, atuando na modulação de granulomas hepáticos e na formação de fibrose (DUNNE & COOKE 2005). Assim, na maioria dos pacientes, a esquistossomose crônica é assintomáticos ou apresenta-se com sintomatologia leve (MALAQUIAS *et al.*, 1997; MONTENEGRO *et al.*, 1999).

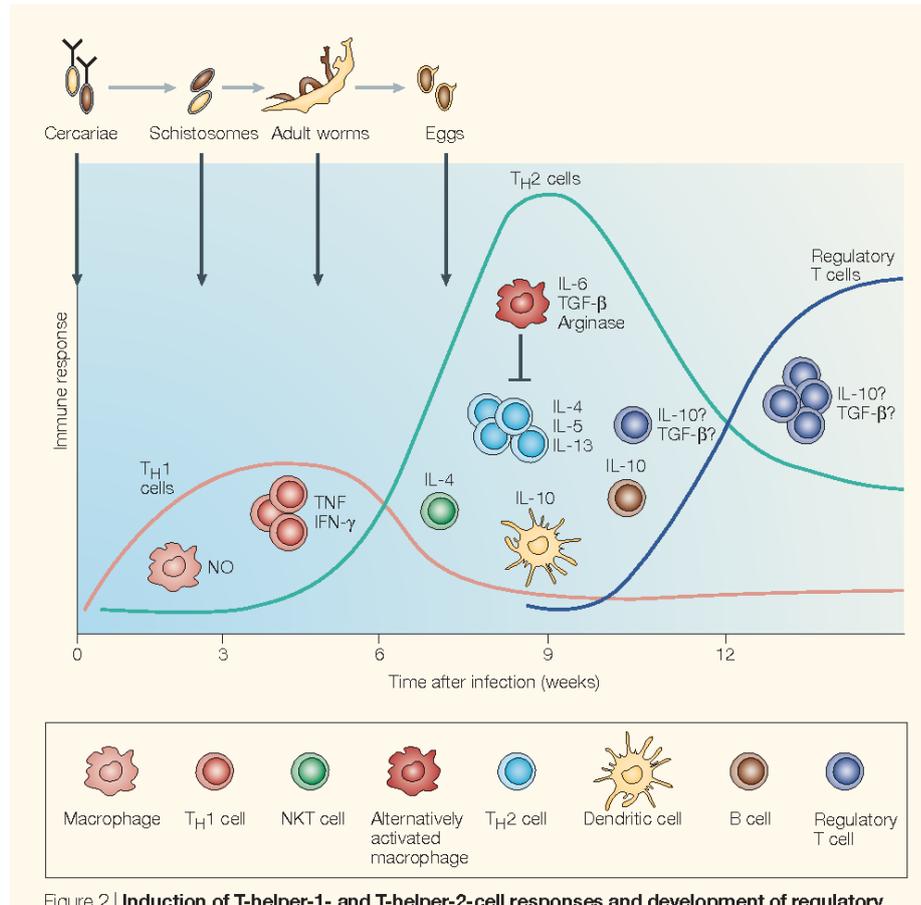


Figura 4. Resposta imune induzida após a infecção por *Schistosoma mansoni* (DUNNE & COOKE, 2005).

O ambiente formado por citocinas induzidas nas diferentes fases da infecção por *S. mansoni* também são determinantes para a estimulação da resposta humoral. Trabalhos que utilizam modelos murinos de infecção por *S. mansoni* demonstraram que, durante as duas primeiras semanas de infecção, a produção de anticorpos reativos ao parasito é baixa, independentemente da carga parasitária utilizada. Entre a terceira e a sétima semana, quando a resposta Th1 encontra-se exacerbada, é evidenciada a produção de anticorpos, especialmente, IgM com baixos níveis de IgG. A partir deste período, há a intensificação da resposta Th2 com inversão nos níveis dos anticorpos produzidos, onde IgG possui níveis mais elevados quando comparados a IgM, especialmente em altas cargas parasitárias (TRIZIO *et al.*, 1980; DUNNE *et al.*, 2005; CONSENZA *et al.*, 2017). Durante a esquistossomose humana, alguns estudos indicam que pacientes em fase aguda produzem elevados níveis séricos de anticorpos IgM e das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3, sendo detectado redução destas

imunoglobulinas com a cronificação da doença e aumento dos níveis de IgE e IgG4 em resposta a antígenos de ovo e verme adulto (KANAMURA *et al.*, 1979; JASSIM *et al.*, 1987; RABELLO *et al.*, 1995; CALDAS *et al.*, 2008).

A idade é um fator importante para a resposta imune do hospedeiro definitivo. Estudos em população humana demonstram que adultos e crianças possuem diferenças de susceptibilidade à esquistossomose, sendo que os jovens são os mais susceptíveis à infecção pelo parasito (BUTTERWORTH *et al.*, 1992; WALTER *et al.*, 2006; VEREECKEN *et al.*, 2007; BLACK, *et al.*, 2010). Segundo os autores a elevada susceptibilidade pode estar associada ao fato de as crianças produzirem preferencialmente anticorpos específicos IgM, e subclasses IgG2 e IgG4 que possuem menor eficiência em mediar a opsonização do parasito. Além disso, competem pela ligação ao antígeno com anticorpos de outros isotipos como IgE, IgG1 e IgG3, que são anticorpos com maior potencial inflamatório, capazes de mediar a destruição do parasito por ativação do sistema complemento (BUTTERWORTH *et al.*, 1992). Na esquistossomose, a resposta imune protetora desenvolve-se lentamente por um período de 10 a 15 anos, e crianças menores de 10 anos de idade, em áreas endêmicas de esquistossomose, são mais suscetíveis à reinfecções após o tratamento com praziquantel, enquanto os adultos são mais resistentes. Essa observação também pode justificar as curvas de prevalência e a correlação da idade e intensidade de infecção observada em áreas endêmicas para esquistossomose (DUNNE *et al.* 1992; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2000). A resposta imune ligada à resistência a reinfecção são associadas às células T helper 2 (Th2) caracterizadas por intensa reação eosinofílica, produção de IgE específica contra esquistossomos e citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10. Muitos estudos de cunho epidemiológico demonstraram associações entre IgE específica, eosinófilos e produção pós-tratamento de IL-4 e IL-5 com resistência a novas infecções após o tratamento (HAGAN *et al.*, 1991; DUNNE *et al.* 1992; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.* 2000; SILVEIRA *et al.* 2002) enquanto IgG4 específica está associada à susceptibilidade à infecção (HAGAN *et al.*, 1991; DUNNE *et al.*, 1992; COLLEY *et al.*, 2014). CALDAS *et al.* (2000) encontraram níveis de IgE aumentados contra SWAP e redução de IgG4 para antígenos solúveis do ovo em um grupo de indivíduos resistentes a reinfecção após o tratamento, sugerindo que essa resistência depende, em parte, do balanço da reatividade entre IgE e IgG4.

Por outro lado, poucos estudos clínicos avaliaram a relação entre a resposta humoral e o quadro clínico da esquistossomose, sendo que estudos publicados indicam uma associação positiva entre os níveis de IgG, especialmente IgG4, e gravidade da esquistossomose (SILVEIRA *et al.*, 2002; BONNARD *et al.*, 2004; CALDAS *et al.*, 2008; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2014). Silveira *et al.* (2002) e Caldas *et al.*, (2008) demonstraram que altos níveis de IgG4 podem ser associada com início de fibroses periportal e esplênica (definidos por exame de ultrassom) em pacientes de áreas endêmicas. Posteriormente, NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, (2014), realizaram um estudo de base populacional em áreas de baixa transmissão da esquistossomose, onde foi possível observar uma associação positiva entre os níveis de IgG reativo ao parasito, principalmente anti- antígeno SWAP (verme adulto), com o tamanho do baço e a espessura da veia porta, que são sinais associados a gravidade da doença. Nesta área, a carga parasitária dos indivíduos foi baixa e não teve associação com a produção de anticorpos específicos ou com a gravidade da doença. Os dados do estudo também revelaram uma correlação inversa entre os níveis de IgE no plasma e a espessura de parede da vesícula biliar, um importante marcador de fibrose na esquistossomose. Estes dados indicaram um papel importante da resposta imune tipo Th2 na modulação do granuloma, e, conseqüentemente, na gravidade da esquistossomose (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2014).

#### **2.4. Controle da esquistossomose**

Os programas implementados para controle da esquistossomose demonstram resultados variados, que incluem a completa eliminação da doença em alguns países, tais como o Japão, e o atual aumento da prevalência em outros, como em certas áreas da China (MINAI *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2007). O aumento da transmissão da esquistossomose conferiu a esta doença um *status* de problema de saúde pública mundial resultando na implantação de programas nacionais de controle em diversos 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). Atualmente o Marrocos e algumas ilhas do Caribe

estão próximos da eliminação e progressos substanciais foram realizados para o controle da infecção no Brasil e Egito (UTZINGER *et al.*, 2009). Por outro lado, a esquistossomose tem sido identificada em áreas consideradas não endêmicas, o que eleva a preocupação por fatores que possam elevar a transmissão da esquistossomose, como migração de indivíduos infectados, turismo rural, desenvolvimento de novas represas e sistemas de irrigação, desmatamento e aquecimento (FENWICK, 2006; STEINMANN *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2008; ENK *et al.*, 2010).

O Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) foi implementado no Brasil em 1975, objetivando a redução do impacto da esquistossomose no Nordeste; posteriormente, no ano de 1983, o programa foi estendido para o estado de Minas Gerais. Atualmente, o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) utilizado em áreas endêmicas brasileiras tem como objetivo o controle da mortalidade e morbidade, através do diagnóstico e tratamento dos infectados com quimioterapia específica, o praziquantel, que resulta em redução da carga parasitária e, conseqüentemente, das formas graves da doença (COURA & AMARAL, 2004; SARVEL *et al.*, 2011).

As atuais estratégias para o controle da esquistossomose que são recomendadas pela OMS e pelo Ministério da Saúde são semelhantes em vários aspectos, especialmente no que se refere 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 em massa sem diagnóstico prévio dirigido aos grupos mais vulneráveis, como jovens em idade escolar e adultos com ocupações que exigem contatos frequentes com focos de transmissão (KATZ, 2018). 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 inteiras que residem em áreas de transmissão, associado ao tratamento dos indivíduos infectados visando à prevenção de formas graves, em consequência na redução dos óbitos e na diminuição da prevalência (BRASIL, 2008).

Atualmente, as atividades do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), que possui como principal pilar o diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados têm resultado em uma significativa redução nos indicadores de morbidade da infecção por *S. mansoni* (AMARAL *et al.*, 2006; SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Estas

medidas de controle geralmente levam a cura parasitológica do indivíduo tratado, mas não previnem a reinfecção, que é frequente em áreas endêmicas. A população de reinfectedos geralmente apresentam redução da carga parasitária e maior dificuldade para o diagnóstico por meio da técnica de Kato-Katz. Outro fator importante para ser observado, é que as medidas de controle adotadas também não são capazes de prevenir a expansão da esquistossomose para áreas não endêmicas, devido a migrações de indivíduos infectados (BLANTON *et al.*, 2015; KATZ, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Consequentemente, grande parte das áreas endêmicas brasileiras são, atualmente, consideradas como áreas de moderada ou baixa endemicidade, onde a maioria dos indivíduos infectados possuem baixa carga parasitária e as técnicas parasitológicas tradicionais não são suficientemente sensíveis para identificar todos os indivíduos infectados e permitir um controle eficiente da transmissão (BARRETO *et al.*, 1990; ENGELS *et al.*, 1996; KONGS *et al.*, 2001; ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

No ano de 2012 foi realizada a Assembleia Mundial da Saúde em Genebra, que tinha como uma das pautas o controle da esquistossomose em áreas de baixa transmissão. Foi verificado que as medidas de controle baseadas no diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados, apesar de importantes não estavam sendo suficientemente eficazes para o controle da esquistossomose (WHO, 2012). Para o controle efetivo da transmissão da doença, foram consideradas formas como melhorias na estrutura de saneamento básico, observadas como essenciais para prevenir infecções dos hospedeiros intermediários e, consequentemente, reduzir as chances de infecções humanas. Ações de controle ambiental, como a coleta e tratamento de dejetos, abastecimento de água potável, instalações hidráulicas e sanitárias, drenagem, limpeza e retificação de margens de córregos e canais (BRASIL, 2005; SARVEL *et al.*, 2011; VITORINO *et al.*, 2012; WHO, 2012). MURTA *et al.*, (2016), também destacam que os determinantes sociais e ambientais da esquistossomose devem ser considerados para estratégias efetivas de controle, incluindo um diálogo com populações que residem em áreas de risco, informando e educando sobre os fatores ambientais ligados à transmissão e ao ciclo de vida do parasito.



### 3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### 3.1. Métodos Parasitológicos

O diagnóstico da esquistossomose é geralmente realizado por meio da visualização direta dos ovos nas fezes dos indivíduos infectados ou em material recuperado em raspagem ou biopsia da mucosa retal, sendo este último método usado com muita restrição devido ao grau de invasão do procedimento (NETO *et al.*, 2008; KNOPP *et al.*, 2011). As técnicas coproparasitológicas são divididos em qualitativos e quantitativos. As técnicas quantitativas além de determinar a presença dos ovos de parasitos são capazes de mensurar o número de ovos presentes por grama de fezes. As técnicas de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972), Gradiente salino (COELHO *et al.*, 2009) e Helmintex (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 2007) são considerados quantitativos.

O exame parasitológico de fezes utilizando a técnica originalmente descrito por KATO & MIURA (1954) e, posteriormente, modificado por KATZ *et al.* (1972) para permitir a quantificação de ovos nas fezes, tem sido a técnica laboratorial recomendada pela OMS para confirmação diagnóstica da esquistossomose mansoni (WHO, 1994). A técnica de Kato-Katz é de baixo custo, não demanda estrutura laboratorial muito sofisticada, é uma técnica de relativamente fácil execução e apresenta grande especificidade devido às características peculiares dos ovos do parasito. Para a realização da técnica de Kato-Katz é feita a coleta de material fecal, a partir da qual é produzida uma lâmina com, aproximadamente, 42mg de fezes para ser lida ao microscópio óptico. É considerado como positivo aquele indivíduo, que apresentar ao menos um ovo de *S. mansoni*, enquanto que a ausência de ovos caracteriza o indivíduo como negativo. Entretanto, deve-se ressaltar que o fato do exame parasitológico ser dado como negativo, não significa, necessariamente, a ausência de infecção, visto o exame utiliza uma quantidade relativamente pequena de fezes para o diagnóstico (CHIEFFI *et al.*, 1978; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Desta forma, a técnica de Kato-Katz é capaz de diagnosticar, de modo eficaz, infecções moderadas e intensas; entretanto, indivíduos com baixa carga parasitária, situações de baixa prevalência e após o tratamento específico, a técnica se torna menos sensível (FERRARI *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2008; ENK *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009). As causas da baixa sensibilidade do diagnóstico

coproscópico estão relacionadas, em parte, com a biologia do parasito uma vez que as fêmeas de *S. mansoni* produzem uma quantidade relativamente pequena de ovos (300-400 ovos/dia), dos quais somente metade é eliminada juntamente com as fezes. Além disto, tem sido verificado que ocorre variação diária na eliminação dos ovos do parasito nas fezes dos indivíduos infectados e o número de ovos produzidos e retidos pode variar no decorrer da infecção (LENZI *et al.*, 2006). Considerando que a excreção fecal de um adulto é cerca de 200 g de fezes por dia, na menor carga parasitária possível, isto é, um casal de vermes, seria eliminado menos que um ovo por grama de fezes diariamente. Como a técnica de Kato-Katz examina 41,7 mg de fezes, na situação mencionada a probabilidade de se detectar esta infecção seria de aproximadamente 1 em 24. Estas limitações podem ser compensadas com a realização de uma maior quantidade do material a ser examinado (aumento do número de lâminas) e/ou coleta de mais de uma amostra por pessoa com intervalos de tempo. Entretanto, a coleta de mais amostras individuais e o aumento do número de lâminas a serem examinadas podem elevar os custos operacionais e dificultar a logística nos programas de controle, tornando-o de baixo retorno para a população (TELES *et al.*, 2003, ENK *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que ao aumentar o número de amostras ou lâminas analisadas, bem como a combinação de diferentes metodologias, em áreas de média e baixa carga (ENK *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011) ou em pacientes com leve e moderada infecção (UTZINGER *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2018), há um aumento da positividade da doença 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 analisado um maior número de lâminas, oriundas de várias amostras e atingindo o valor de 35,8% quando combinado mais métodos de diagnóstico (ENK *et al.*, 2008). Além disso, esta técnica possui baixa reprodutibilidade, quando se examinam diferentes lâminas do mesmo indivíduo; leituras díspares são obtidas por examinadores diferentes e apresenta resultados falso-negativos, quando aplicada em amostras de fezes de pacientes que estão em período pré-patente (KONGS *et al.*, 2001; BERHE *et al.*, 2004).

A técnica do Gradiente Salino (COELHO *et al.*, 2009) foi criada com o objetivo de desenvolver uma ferramenta descrita como simples e mais sensível para o

diagnóstico da esquistossomose no campo. O princípio desta técnica se baseia na propriedade dos ovos de *S. mansoni* de sedimentarem em gradiente de concentração de solução de cloreto de sódio 3% (solução salina concentrada), enquanto grande parte dos detritos de baixa densidade da amostra fecal, que pode corresponder a mais de 90% do total, flutuam e podem ser eliminados. Dessa forma, uma maior quantidade de fezes (500 mg) pode ser examinada, melhorando a sensibilidade do exame de fezes. Os autores relatam tratar-se de uma técnica que possui baixo custo, fácil e rápida execução e que traz como grande vantagem, redução no número final de lâminas a serem examinadas e como consequência, redução do tempo de análise ao microscópio. Além disso, os ovos mantêm sua morfologia intacta sendo facilmente identificados, ao contrário do que ocorre com a técnica de Kato-Katz, que preserva apenas o contorno externo dos ovos. Resultados preliminares demonstraram que esta técnica, examinando-se 500 mg de fezes, apresentou maior sensibilidade que 12 lâminas de Kato-Katz (12 x 41,7 mg ~ 500 mg) de uma única amostra fecal (COELHO *et al.*, 2009). Entretanto, esta capacidade diagnóstica não foi verificada por OLIVEIRA *et al.*, (2018).

O Helmintex® é uma técnica coproparasitológica altamente sensível que permite o processamento de uma amostra de 30 gramas de fezes, através de uma sequência de passos de concentração, que termina com o isolamento dos ovos pela sua interação com esferas paramagnéticas, em um campo magnético (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 2007). Estudos demonstram que o Helmintex® é mais sensível que a técnica 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 (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 2007). PINHEIRO *et al.* (2012), observaram uma prevalência de 47,1% por meio da técnica Helmintex®, 8,75% utilizando Kato-Katz e 18% do gradiente salino. Apesar de apresentar alta sensibilidade, esta técnica tem baixa aplicabilidade em estudos de campo, sendo necessário seu processamento em laboratórios equipados e avaliação de um grande número de lâminas geradas a partir do sedimento final produzido (PINHEIRO *et al.*, 2012).

### 3.2. Métodos Moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular baseada na detecção e amplificação de sequências específicas do DNA ou do ácido ribonucleico RNA (*Ribonucleic acid*) do parasito, sendo utilizado em diferentes amostras biológicas como sangue, fezes e urina podendo ser mais sensível para detecção de baixa carga parasitária de vários agentes infecciosos (HAMBURGER *et al.*, 1991).

No caso da esquistossomose, diversos alvos testados foram identificados como possíveis biomarcadores da infecção ativa por *S. mansoni*, *primers* como SRA1 (*steroid receptor RNA activator 1*), SRS2 (*ATP-dependent DNA helicase*) e pSml-7 (110 pb) foram propostos demonstrando eficácia no diagnóstico (PONTES *et al.*, 2002; GUEGAN *et al.*, 2019). Alguns estudos indicam que o uso da técnica de PCR com primer de 121pb que possui inúmeras repetições no genoma de *S. mansoni* tem se mostrado eficiente na identificação dos casos positivos de infecção mesmo em pacientes com baixa carga parasitária; além disto, a técnica permite um correto diagnóstico de indivíduos negativos (PONTES *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SENRA *et al.*, 2019), com níveis de sensibilidade próximos a 90% e níveis de especificidade próximos a 100%. HUSSEIN *et al.* (2012) utilizando modelo experimental de camundongos verificou a presença do DNA do parasito no soro três dias após infecção, sugerindo que a PCR pode ser aplicada para o diagnóstico em fase pré-patente. Entretanto, como limitações para uso do diagnóstico em campo a técnica de PCR possui elevado custo, necessidade de infraestrutura adequada e capacitação de técnicos (WEERAKOON *et al.*, 2018).

### 3.3. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos podem ser ferramentas robustas na triagem de indivíduos positivos para a esquistossomose em inquéritos epidemiológicos, principalmente nas situações caracterizadas por indivíduos com baixa intensidade de infecção, com infecção crônica ou unissexuada, que limitam o diagnóstico por técnicas parasitológicas de fezes. (GONÇALVES *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2010).

As técnicas imunodiagnósticas podem ser utilizadas tanto para detecção de antígenos circulantes de *Schistosoma* (método direto) como para detecção de anticorpos produzidos contra o parasito (método indireto). Vários testes imunológicos

têm sido propostos para o diagnóstico da esquistossomose, os mais comuns e amplamente utilizados são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), teste de precipitina circunoval (Circunoval precipitin test - COPT), o teste de hemaglutinação indireta (IHAT), teste de imunofluorescência indireta (RIFI) western blot (WB) e point of care (POC-CCA ou POC-CAA) (CAVALCANTI *et al.*, 2013; WEERAKOON *et al.*, 2015).

A reação periovular ou teste de precipitina circunoval (COPT), descrita por OLIVER-GONZALEZ (1954), trata-se da formação de um precipitado por componentes do sistema complemento que ocorre em torno de ovos frescos de *S. mansoni* quando incubados com soro de pacientes infectados. Este método tem sido utilizado para o diagnóstico de infecções por *Schistosoma* apresentando elevadas sensibilidade (92-100%) e especificidade (96-100%) (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014). As limitações deste teste são o tempo para execução da técnica (48 horas), disponibilidade de ovos do parasito e períodos distintos de soroconversão de indivíduos infectados após tratamento. Experiências realizadas na Venezuela relataram que após um ano do tratamento 64% dos pacientes se mantinham sorologicamente reativos e na China aproximadamente 82% da população testada levou quatro anos para atingir soroconversão. (ZHU *et al.*, 2005; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007).

A técnica de hemaglutinação indireta, IHAT, consiste na aglutinação em hemácias de carneiro adsorvidas com antígenos de *Schistosoma*, sendo comumente utilizado antígeno de ovo (SEA), para a detecção de soros positivos. A IHA foi aplicada em estudos populacionais na China como um teste alternativo para detectar infecção humana com *S. japonicum*. Embora a técnica tenha apresentado bons níveis de sensibilidade (71% -97%), a sua especificidade é baixa ou extremamente variável, tornando-a inadequada para levantamento da infecção por *S. japonicum* na população (SORGHO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2007). Dentre as limitações dessa técnica pode-se destacar: características intrínsecas da técnica, como tipo de antígeno e hemácia; possível persistência de reações positivas após o tratamento e reações cruzadas com outros helmintos (ZHOU *et al.*, 2007 ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014).

A RIFI foi aplicada 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 pela técnica de Kato-Katz foi de 1,6% (leitura de três lâminas para uma amostra de fezes) e 33,2% e 33,5% de acordo com os métodos IgG-RIFI e IgM-RIFI, respectivamente. Os autores sugerem que a discrepância pode ser explicada pela maior sensibilidade da reação imunológica frente ao teste parasitológico que utilizou uma única amostra fecal. Entretanto, estudos mais detalhados, com correta identificação de indivíduos infectados são necessários para confirmação desta informação. Como limitação para utilização em áreas endêmicas, esta técnica necessita de um microscópio especial de fluorescência, pessoas bem treinadas e reagentes específicos (BURLANDY-SOARES *et al.*, 2003).

Uma alternativa de diagnóstico foi desenvolvida utilizando a detecção do antígeno CCA, pelo teste imunocromatográfico POC-CCA® (*Point-of-Care Rapid Medical Diagnostics*, Pretoria, África do Sul). Este método trata-se de um ensaio de fluxo lateral, comercialmente disponível, utilizado para detectar o CCA, um proteoglicano derivado do epitélio do tubo digestivo, que é filtrado pelos rins e excretado na urina do hospedeiro (POLDERMAN & DEELDER, 2000; VAN DAM *et al.*, 2004; STOTHARD *et al.*, 2006; COLLEY *et al.*, 2013). O teste foi considerado eficaz e confiável, principalmente em áreas endêmicas da Ásia e África e em indivíduos com elevada intensidade de infecção (COULIBALY *et al.*, 2011; SHANE *et al.*, 2011; COLLEY *et al.*, 2013, ADRIKO *et al.*, 2014). Entretanto, em populações com baixa carga parasitária o teste perde em sensibilidade e especificidade (SIQUEIRA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2019). Também foi demonstrada uma grande discrepância ao se utilizar diferentes lotes do teste comercial POC-CCA® para realizar o diagnóstico do parasito em uma mesma população (GONÇALVES *et al.*, 2019).

O ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é o teste mais comumente utilizado para detecção da infecção por *S. mansoni*. A técnica permite detectar várias classes e subclasses de anticorpos com base no reconhecimento de antígenos distintos que podem ser expressos em qualquer uma das fases da infecção aderidos às placas de poliestireno. Além disto, a técnica de ELISA permite testar um grande número de amostras simultaneamente, apresenta boa reprodutibilidade e facilidade de realização. Desta forma, alguns estudos sugerem que está é uma técnica

sensível e que pode ser útil para levantamentos epidemiológicos da esquistossomose (DA SILVA *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 2004; SORGHO *et al.*, 2005; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007; BOTELHO *et al.*, 2009). Estudos realizados com imigrantes demonstraram grande eficácia da sorologia no diagnóstico da esquistossomose possuindo sensibilidade de aproximadamente 95% (WANG *et al.*, 2012; KINKLE *et al.*, 2012; CHERNET *et al.*, 2017). Entretanto, quando a técnica é utilizada em áreas endêmicas, observa-se diminuição da acurácia diagnóstica, especialmente devido a indivíduos negativos que apresentam reação sorológica ao teste (APPLEBY *et al.*, 2014; SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

Os estudos que se utilizam de técnicas sorológicas para diagnóstico apresentam algumas limitações, como: variação dos títulos de anticorpos individuais, que podem permanecer ou aumentar após o tratamento (SOENTJENS *et al.*, 2014b; HINZ *et al.*, 2017); a inabilidade em distinguir entre infecção passada, aguda ou reinfeção (WILKINS & KEYSTONE, 2013; ELBAZ & ESMAT, 2013; GRENFELL *et al.*, 2014; HINZ *et al.*, 2017); soro conversão tardia ou ausente (SOENTJENS *et al.*, 2014a) ou uma resposta decrescente de anticorpos em indivíduos de áreas endêmicas, devido às constantes exposições ao parasito (DUVALL *et al.*, 2014; HINZ *et al.*, 2017). Tais limitações podem levar a resultados de baixa confiabilidade (HINZ *et al.*, 2017). Quando estes ensaios são usados em áreas de baixa endemicidade, estratégias diagnósticas auxiliares devem ser utilizadas 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 diagnóstico e controle da esquistossomose tem levado à investigação por diferentes antígenos (CAVALCANTI *et al.*, 2013). A triagem de antígenos adequados representa uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de testes de diagnóstico. Diante disso, sabe-se que existem alguns fatores que podem influenciar na seleção de um antígeno apropriado, tais como: facilidade de obtenção e produtividade, alta estabilidade em condições de estocagem e elevada antigenicidade (RABELLO *et al.*, 2008).

Os antígenos utilizados atualmente em ensaios imunodiagnósticos podem ser obtidos de diferentes estágios evolutivos do parasito (HINZ *et al.*, 2017). 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.

A detecção de antígenos de *Schistosoma* foi inicialmente baseada na utilização de antígenos brutos de diferentes estágios, como antígenos de cercárias que são menos utilizados por apresentar baixos níveis de acurácia (LUNDE & OTTESEN, 1980). Proteínas de esquistossômulos são apontadas por apresentarem grande sensibilidade (HINZ *et al.*, 2017), sendo mais eficazes para diagnosticar indivíduos infectados residentes em áreas endêmicas (GRENFELL *et al.*, 2013a, 2013b; HINZ *et al.*, 2017). Também são utilizados antígeno solúvel de ovo (*Soluble egg antigen* – SEA) e antígenos solúveis de verme adulto (*Soluble worm adult protein* - SWAP). O antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) é a fonte que possui maior abundância de material antigênico (DOENHOFF *et al.*, 2004). O homogenato de ovos, conhecido como antígeno solúvel de ovo (SEA), contém grande número de frações antigênicas, apesar de somente uma minoria destes constituintes serem liberados por ovos viáveis, também se apresenta com uma melhor acurácia diagnóstica, quando comparado ao SWAP extraído em tampão fosfato (ASHTON *et al.*, 2001; HINZ *et al.*, 2017). Estes antígenos podem apresentar sensibilidade moderada ou alta em ensaios de ELISA para diagnosticar infecção por *S. mansoni*, mas geralmente apresentam baixa especificidade (DOENHOFF *et al.*, 1993; 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). Estudos em áreas endêmicas no Brasil, que testaram reatividade de IgG a antígenos de *S. mansoni*, obtiveram desempenho moderado, com sensibilidade variando de 60-80% quando comparadas ao método de Kato-Katz com uma amostra fecal e realização de duas lâminas. Nesta comparação a sorologia se mostrou mais sensível em comparação com o método parasitológico. A discrepância observada entre a sorologia e o método parasitológico também pode ser justificada pela baixa sensibilidade do Kato-Katz em áreas onde a população apresenta baixa carga parasitária (VENDRAME *et al.*, 2001; GRENFELL *et al.*, 2013; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014). Outra alternativa são os fracionamentos antigênicos, provenientes de extratos totais tem se mostrado eficazes na melhoria do desempenho diagnóstico OLIVEIRA *et al.*, (2005) utilizando antígeno fracionado de verme adulto de *S. mansoni* (AWA) pela técnica de ELISA frente a IgM e IgG conseguiu encontrar sensibilidade e especificidade de 98%, possuindo valores de concordância entre o teste sorológico e parasitológico entre 0.95-0.98, considerados excelentes.

Antígenos de diferentes fases evolutivas (cercaria, ovo e verme adulto) extraído em tampão contendo carbonato foram utilizados por alguns anos para o diagnóstico da esquistossomose por meio de um teste rápido de intradermorreação (ELIAKIM & DAVIES 1954; PELLEGRINO, 1958). WARREN *et al.*, (1973) conduziram um estudo em duas localidades do Caribe (St. Lucia e St. Vincent), para avaliar infecções por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, sendo que na comunidade de St. Lucia foram analisados 350 indivíduos e em St. Vincent 171. O desempenho da técnica da intradermorreação na comunidade de St. Vincent foi de 89 a 95%, sendo que apenas *S. haematobium* (74%) apresentou um menor desempenho nesta área por demonstrar uma menor sensibilidade em crianças. Na comunidade de St. Lucia o teste da intradermorreação para *S. mansoni* apresentou uma menor eficácia (66%), devido à diminuição da sua sensibilidade, também foi verificado que a resposta para o teste era mais longa, entretanto foi sugerido que poderia ser mais específico. Outro estudo realizado em Porto Rico avaliou diversas técnicas parasitológicas e sorológicas para o diagnóstico da esquistossomose. Foram avaliados 485 pacientes internados com os sintomas da doença, realizaram-se exames de fezes e intradermorreação. No teste de intradermorreação foram utilizados três antígenos de fases distintas de *S. mansoni*, cercaria, verme adulto e ovo, sendo o antígeno de cercaria o que se apresentou mais imunogênico quando comparado aos outros dois antígenos. Também foram avaliados que idade e sexo são fatores que podem influenciar a capacidade diagnóstica do teste, obtendo dificuldades em diagnosticar crianças (JACHOWSKI & ANDERSON, 1961). O teste de intradermorreação apesar de ter sido uma técnica altamente sensível para identificar indivíduos primo-infectados, a reatividade da resposta celular permanecia por longo período após a cura parasitológica (GAZZINELLI *et al.*, 1965). Além disto, o teste diagnóstico baseava-se na aplicação subcutânea do antígeno, podendo causar reações alérgicas em alguns indivíduos, que levou a interrupção do seu uso. Entretanto, estas preparações antigênicas não foram testadas em outras técnicas para fins de diagnóstico.

Estudos que tem por finalidade a identificação de biomarcadores específicos para esquistossomose se utilizam da técnica de western blot. Esta técnica baseia-se na separação de proteínas por tamanho (1D), ou por ponto isoelétrico e posteriormente por peso molecular (2D). Trabalhos utilizando modelos experimentais ou populacionais que visam buscar e identificar alvos diagnósticos específicos para

esquistossomose objetivando a melhoria do diagnóstico sorológico têm sido realizados utilizando-se principalmente antígenos brutos de ovos ou vermes adultos (LUDOLF *et al.*, 2014; RANASINGHE *et al.*, 2015; WEERAKOON *et al.*, 2015; KARDOUSH *et al.*, 2016; SILVA-MORAES *et al.*, 2019). A comparação proteômica por western blot 2D, demonstrou que vermes adultos de *Fasciola hepatica* e *S. mansoni* compartilharam 28 spots, em modelo experimental de infecção num total de 361 e 433 spots encontrados, respectivamente (BOUKLI *et al.*, 2011).

Uma das maiores dificuldades enfrentadas na pesquisa por testes de diagnóstico baseados no reconhecimento por anticorpos é a ocorrência de reações cruzadas. Isso é especialmente evidenciado 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 ou fracionados 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) and *S. haematobium* (HAMA) e antígeno g31/3234-36. Esta abordagem tem sido bastante utilizada com o intuito de melhorar 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. Entretanto, pode-se perder sensibilidade, pois geralmente estas proteínas são sintetizadas por bactérias que são incapazes de realizar modificações pós-traducionais que são importantes para a reação do sistema imunológico (RABELLO *et al.*, 2008; BRONDYK, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2013; HINZ *et al.*, 2017; EGESA *et al.*, 2018; ANGELES *et al.*, 2019). Recentemente, um trabalho realizado no Brasil, identificou uma proteína presente no ovo de *S. mansoni* específica através de testes proteômicos, denominando-se rMEA ou *Major egg antigen*. Após a obtenção da proteína recombinante, ela foi testada pela técnica de ELISA tendo como referência a leitura de duas lâminas de Kato-Katz. O método parasitológico apresentou uma sensibilidade de 38.7% e 100% de especificidade, enquanto a ELISA realizada frente à proteína recombinante apresentou 87.1% de sensibilidade e especificidade de 89.09%. Esta técnica foi capaz ainda de detectar indivíduos positivos com cargas parasitárias <10 OPG em 87.5% (SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Desta forma, fica evidente a necessidade de melhor avaliar novas

estratégias sorológicas como alternativas mais sensíveis para o diagnóstico da esquistossomose em indivíduos com baixa carga parasitária.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A presente proposta se justifica pela grande importância médica da esquistossomose no Brasil, sendo a doença tropical negligenciada de maior impacto na saúde dos indivíduos que residem em Minas Gerais (MARTINS-MELO *et al.*, 2018), e pela baixa sensibilidade do exame parasitológico de escolha (técnica de Kato-Katz) para identificar indivíduos infectados com baixa carga parasitária (COELHO, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2019), impedindo assim um controle efetivo da doença e eliminação. Estudos revelam que áreas endêmicas para esquistossomose, principalmente Minas Gerais e Bahia, que originalmente caracterizavam-se por altas prevalências de infecção e indivíduos infectados com altas cargas parasitárias, sofreram grandes modificações no perfil de transmissão da infecção, devido às sucessivas intervenções terapêuticas, melhorias sanitárias e educação, sendo atualmente verificadas que a maioria dos indivíduos infectados apresentam baixas cargas parasitárias.

Diante disto, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de ferramentas complementares de diagnóstico aplicável a nova realidade, observada em áreas endêmicas brasileiras, que permitam aumentar a sensibilidade do diagnóstico da esquistossomose, principalmente em indivíduos com baixa carga parasitária, permitindo assim um levantamento da prevalência com maior precisão, que permita medidas que possam levar ao controle e erradicação da transmissão desta parasitose.

## 5. OBJETIVO

### 5.1. Objetivo Geral

Avaliar eficácia de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando SWAP-carbonato como ferramenta de diagnóstico para indivíduos infectados por *S. mansoni* com baixa carga parasitária.

#### 5.1.1 Objetivos específicos

Padronizar a técnica de ELISA para avaliar a reatividade de subclasses de IgG contra extrato SWAP-carbonato de *S. mansoni*.

Validar os testes sorológicos com soros de indivíduos residentes em área endêmica utilizando como referência técnicas parasitológicas anteriormente aplicadas.

Verificar a evolução da reatividade sorológica das diferentes subclasses de IgG1, IgG3 e IgG4 após 12 meses de tratamento e cura de indivíduos infectados.

Obter e caracterizar o perfil eletroforético do extrato SWAP carbono e identificar o padrão de reconhecimento de bandas específicas do extrato antigênico SWAP-carbonato por anticorpos presentes no soro de indivíduos com diferentes perfis parasitológicos.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Área de Estudo

A pesquisa foi conduzida com soro de indivíduos residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo (15°25'54'' S e 44°24'42'' O) figura 5. No município de Januária, situado na região norte do estado de Minas Gerais, região endêmica para a *S. mansoni*. Neste local residem aproximadamente 270 habitantes, cujas residências estão situadas entre os córregos Pé da Serra, Santana e Tocantins onde existem relatos de pequenas populações de *B. glabrata*, hospedeiro intermediário do parasito.

### 6.2. População do estudo

No presente estudo foram utilizadas amostras de soro de residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo que participaram do estudo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE#21824513.9.0000.5091), este projeto recebeu apoio financeiro do DECIT-2012.

Foram incluídos no estudo moradores da região, com idade superior a 6 anos, de ambos os sexos, que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Ao chegar nos domicílios, os pesquisadores apresentaram os objetivos, riscos e confiabilidade 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.

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. Foram excluídos da população de estudo, indivíduos portadores de doenças cognitivas e psiquiátricas, distúrbios de comportamento, gestantes e mulheres em período de amamentação, indivíduos que optaram por não assinar o TCLE ou que não entregaram amostras biológicas. Os pacientes diagnosticados com infecção por *S.*

*mansoni* ou alguma geohelmintose receberam tratamento com praziquantel (40-60mg/Kg) ou albendazol (400mg/dose unica), respectivamente.

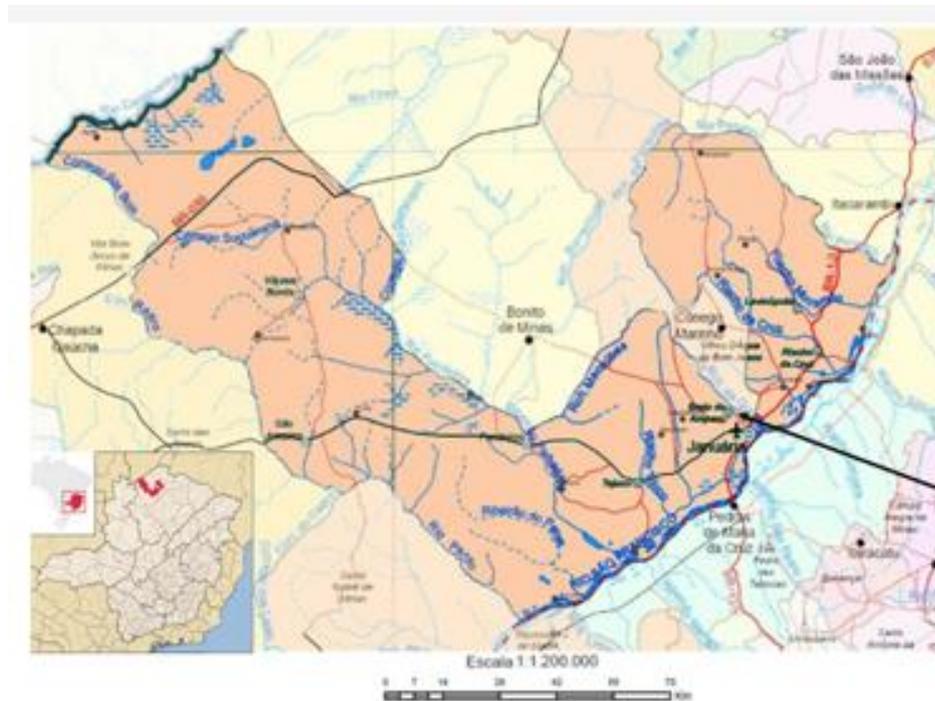


Figura 5. Localização geográfica do Estado de Minas Gerais no Brasil e localização da área endêmica no município de Januária, região norte de Minas Gerais.

### 6.3. Coletas e processamento das amostras

Em um ano de estudo, foram realizadas duas coletas a campo, a primeira no tempo zero marcando o início do estudo e a segunda um ano após o início do trabalho, denominando-se tempo 12. Em ambos os tempos os participantes foram convidados a fornecer três amostras fecais, que foram recolhidas em dias consecutivos. A primeira amostra fecal foi recolhida em recipiente de plástico de 500 ml, suficiente para uma evacuação completa e as outras duas amostras fecais eram menores e foram coletadas em potes de plástico de 80 ml. O material fecal do primeiro dia de coleta foi utilizado para preparação de 14 lâminas (KK) (KATZ *et al.*, 1972), 500mg das fezes foram utilizadas para realização da técnica de Gradiente Salino (COELHO *et al.*, 2009), 30 g para a técnica de Helmintex® (TEIXEIRA *et al.*, 2007) e o restante das fezes foi processado para realização do método de sedimentação espontânea HPJ. A segunda e terceira amostras de fezes de cada indivíduo foram utilizadas para realização de duas lâminas de Kato-Katz por amostra. As amostras fecais foram levadas para o laboratório de campo em Januária e imediatamente processadas para realização de

análises parasitológicas. Foram considerados positivos para esquistossomose os indivíduos que apresentaram pelo menos um ovo do parasito em qualquer técnica parasitológica utilizada. O OPG foi calculado utilizando-se 6 lâminas de Kato-Katz (2 de cada amostra de fezes), onde o número total de ovos encontrados nas lâminas foi dividido por 6 e multiplicado por 24 para a obtenção do número de ovos por g de fezes (OPG). Estes dados foram obtidos no estudo inicial e utilizados para criação de bancos de dados que suportaram este estudo com o intuito de obter uma referência parasitológica de infecção ativa por *S. mansoni* para as comparações necessárias no presente estudo.

A coleta de sangue venoso foi conduzida em crianças e adultos, na região da mão e do antebraço e foram coletados no máximo dois tubos para obtenção de soro. Em adultos, o volume máximo de sangue retirado foi de 15 ml em tubo sem anticoagulantes e em crianças ou adolescentes (6-17 anos) o volume foi reduzido para 10 ml. A amostra foi centrifugada para retirada do soro, que posteriormente foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes sorológicos, maiores detalhes sobre o processamento das amostras estão publicados por OLIVEIRA *et al.*, (2018). O fluxograma na figura 6 mostra o número total de amostras analisadas por cada teste parasitológico e sorológico.

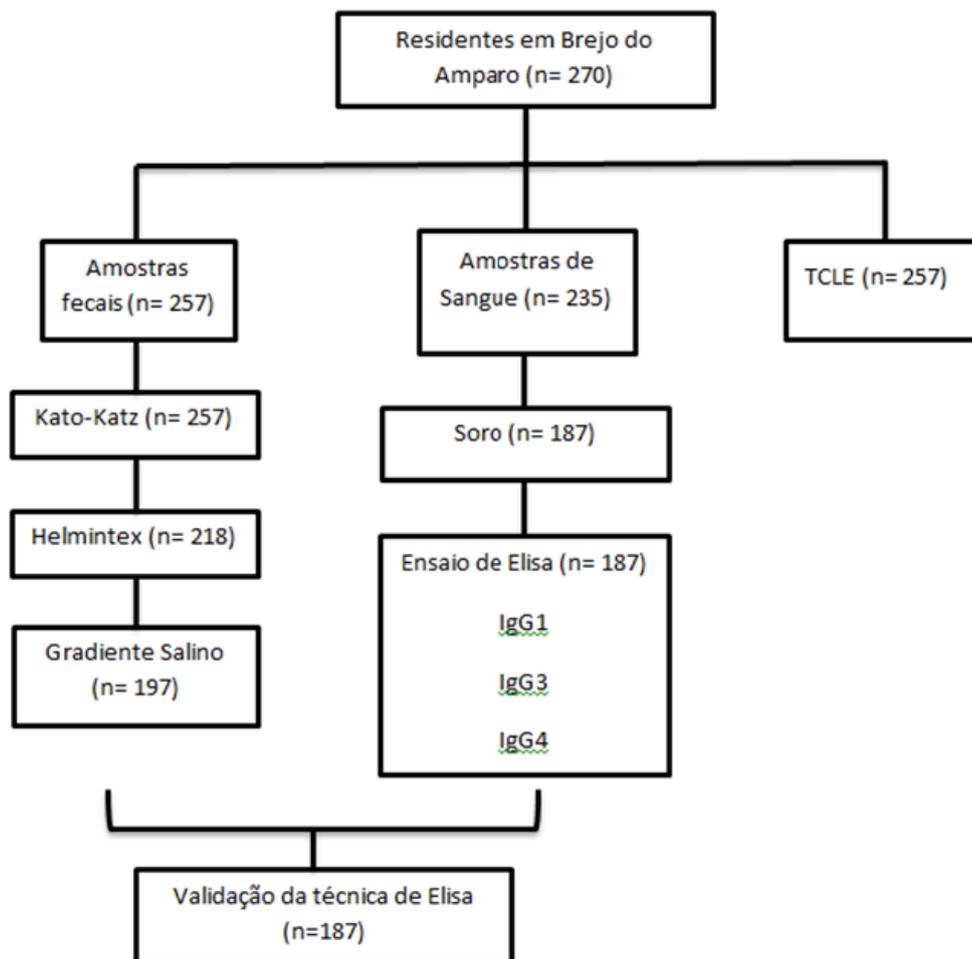


Figura 6 Fluxograma demonstrando a coleta das amostras biológicas e sua utilização no estudo

#### 6.4. Extrato antigênico de *S. mansoni*

No presente estudo utilizou-se o extrato antigênico total de verme adulto (SWAP-carbonato) anteriormente empregado na técnica diagnóstica da intradermoreação (ELIAKIM & DAVIES 1954; PELLEGRINO, 1958). A cepa de *S. mansoni* utilizada (LE) tem sido mantida no laboratório de esquistossomose no Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG) por sucessivas infecções de caramujos *B. glabrata* e hamsters *Mesocricetus auratus*. Este processo de manutenção é aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 368/2018). Para a produção do SWAP-carbonato camundongos BALB/c foram infectados com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni* por seis semanas, após, os camundongos foram perfundidos pelo sistema porta-hepático para a recuperação de vermes adultos (PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956). Os vermes adultos recuperados foram lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS cloreto de sódio 0.14M,

fosfato de sódio 0.0074M e fosfato de sódio monobásico 0.0029M pH 7.4), congelados em nitrogênio líquido e macerados em tampão carbonato (bicarbonato de sódio 0.021M e mertiolato 0.003M) sendo adicionado inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail Sigma-Aldrich Brasil Ltda) na concentração 1:100 e permanecendo 24h na geladeira (ELIAKIM & DAVIES 1954; PELLEGRINO, 1958). No dia seguinte, a solução antigênica foi centrifugada (Eppendorf 5810R- 11200g a 4° por 60 min) o *pellet* formado foi descartado e o sobrenadante coletado para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

### 6.5. Ensaio Imunoenzimático de ELISA

A presença de imunoglobulinas reativas contra antígeno de *S. mansoni* no soro de cada indivíduo foi determinada por um ensaio imunoenzimático (ELISA). Para a realização do ensaio, a diluição dos diferentes reagentes e do soro dos indivíduos foi previamente determinada. Resumidamente, placas de 96 poços (Nunc-Maxisorb Nagle Nunc International, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100µL/poço de tampão carbonato-bicarbonato 0.1 M (pH 9,5) contendo 10 µg/ml de antígeno de verme adulto. Incubando-se as placas durante a noite a 4° protegidas com plástico para evitar a dessecação. No segundo dia, as placas foram bloqueadas durante 1 h com tampão PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) a temperatura ambiente. Após o procedimento de bloqueio e entre cada passo de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20-Sigma). Após a lavagem, foi adicionado 100µl/poço de soro de cada paciente diluído 1:100 em tampão de diluição (PBS 0,05% de Tween e 0,1% de BSA) e as placas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente. Cada paciente foi testado em duplicata e 15% das amostras, selecionadas de maneira aleatória, foram retestadas para avaliar a reprodutividade do ensaio. Na sequência foi adicionado 100µl/poço do tampão de diluição contendo anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado com biotina diluídos em tampão de diluição, sendo utilizado anticorpo monoclonal anti-IgG1 humana na diluição de 1:1.000 (Mouse Monoclonal Anti-human IgG1 biotin conjugated - clone 8c/639 - SIGMA ALDRICH®, USA), anti-IgG3 humana na diluição de 1: 20.000 (Mouse Monoclonal Anti-Human IgG3-Biotin conjugated – clone HP- 6050 SIGMA) e anti-IgG humana na diluição de 1:20.000 (Mouse Monoclonal Anti-Human IgG4-Biotin conjugated, clone HP 6025 SIGMA), permanecendo por 1h em temperatura ambiente. O próximo passo foi a adição de

100µl/poço de tampão de diluição contendo Streptoavidina conjugada com fosfatase alcalina (Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*- SIGMA®, USA) na proporção de 1:2000 e incubação por 1 h em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi revelada pela adição do substrato pNPP (SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate Tablets -SIGMA®, USA), diluído em 20mL de água destilada sendo adicionado 100µL em cada poço, reagindo por 15 minutos e posteriormente a reação foi interrompida com 50µL da solução 3M de NaOH. As placas foram lidas no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices, San José, CA, EUA) a 405nm. Em cada placa foram adicionadas amostras de soro de cinco indivíduos verdadeiramente negativos (não foram encontrados ovos de qualquer helminto em todos os quatro testes parasitológicos). O valor de absorbância obtida para cada participante do estudo foi dividido pela média de absorbância obtida dos soros negativos acrescida de quatro desvios padrões, em cada placa e para cada isotipo. O valor obtido é denominado de reatividade relativa, sendo que valores superiores a um são considerados reativos sorologicamente para esquistossomose.

#### **6.6. Perfil eletroforético do antígeno SWAP carbonato (eletroforese)**

Proteínas do extrato antigênico de verme adulto de *S. mansoni* (SWAP-carbonato) foram eletroforéticamente separadas em SDS-PAGE gel usando o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970), no aparelho Mini-PROTEAN® Tetra (Cell Bio-Rad, USA). Para tanto, amostras de 2mg/mL de SWAP-carbonato foram diluídas 1:6 em tampão de amostra (TrisCl/SDS 0.28M pH 6.8, glicerol 30% v/v, SDS 1% m/v, azul de bromofenol 0.0012% m/v), incubadas a 100° por cinco minutos e centrifugadas a 450g por cinco minutos (Eppendorf 5810R). A amostra do extrato antigênico e a referência de padrão molecular (*ColorBurst Electrophoresis Marker*- Sigma) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 4 % (4% de mistura de acrilamida a 30% e bisacrilamida a 0,8% em 0.125 M de Tris-HCl, pH6.8, com adição de 10 % de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED – reagentes da SIGMA) para o empacotamento das proteínas e a separação das proteínas ocorreu em gel de poliacrilamida a 10 %. A eletroforese foi realizada em tampão glicina (0.192M de glicina, 0.025M de Tris-Base 0.5% SDS, pH8.3) sendo aplicadas correntes elétricas constantes de 100 V por cerca de 2h até o final da corrida. Após a separação eletroforética, o gel foi retirado, fixado por 20 minutos em solução de fixação de

formaldeído (metanol 40% v/v e formaldeído 0,5ml/L) e lavado em água destilada duas vezes por cinco min para realização da coloração rápida de prata (MERRIL *et al.*, 1981). Para tanto, o gel foi incubado por 10 min em solução de tiosulfato a 0.00012M, lavado rapidamente em água destilada e incubado por 1 h em solução de nitrato de prata 0.1%. A solução de prata foi descartada e o gel foi lavado brevemente com água e solução de desenvolvimento de tiosulfato (carbonato de sódio 3% m/v, tiosulfato de sódio 0,0004% m/v e formaldeído 0,5ml/L), o gel foi então incubado com solução de desenvolvimento de tiosulfato por cinco minutos até o aparecimento das bandas. A revelação foi interrompida pela adição de 2.5ml da solução de ácido cítrico 2.3M por 10 min, o gel então foi lavado com água destilada por 10 min e colocado em solução de secagem (etanol 10% v/v, glicerol 4% v/v). Todos os passos foram realizados sob agitação (Agitador Orbital 255-B).

## 6.7. Western Blot

Para a realização de ensaios de western blot, proteínas do extrato antigênico SWAP-carbonato foram eletroforéticamente separadas em SDS-PAGE gel como descritos no item 6.6. Após a finalização da corrida as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Bio-Rad) por 4h, utilizando o equipamento (Mini-Protean Tetra) a 20 V a 4° C em tampão de transferência (Trizma base 0.15M, glicina 1.14M, metanol 0.01M pH 8.3). Ao final da transferência as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (0.1M de TrisCl, 1.4M NaCl, 1% Tween-20, e 1% BSA) por 1h, seguido por 6 ciclos de lavagem com tampão de lavagem (0.1M de TrisCl, 1.4M NaCl, 1% Tween-20) 5 min cada, este processo de lavagem foi realizado entre cada etapa do processo de revelação. Após as lavagens as membranas foram incubadas com um pool de soro de indivíduos possuindo diferentes *status* parasitológico (Tabela 1) diluídos em tampão de diluição 1:100 por 12h a 4° (0.1M de TrisCl, 1.4M NaCl, 1% Tween-20, e 0.1% BSA). As membranas foram então incubadas com tampão de lavagem contendo anticorpos anti-Ig humana IgG1 (Monoclonal AntiHuman IgG1 Clone8c/639 Biotin Conjugate Immunoglobulin Fraction of Mouse Ascites Fluid- SIGMA®, USA) ou IgG4 (Monoclonal Anti-Human IgG4-Biotin, clone HP 6025 produced in mouse, purified immunoglobulin- SIGMA - ALDRICH®, USA), nas concentrações 1:1000 ou 1:2000, respectivamente por 1h ao abrigo da luz. A membrana foi incubada com a adição de solução de lavagem contendo Streptoavidina conjugada a fosfatase alcalina na concentração (1:2000 - *Streptavidin-Alkaline Phosphatase* from Streptomyces

avidinii- SIGMA® USA) seguido do substrato revelador BCIP (SIGMAFAST™BCIP®/NBT tablet) até o aparecimento de bandas específicas.

Tabela 1 Relação dos pools de soros escolhidos para a verificação da reatividade contra o antígeno SWAP

(1) Pool positivo para <i>S. mansoni</i> alta carga > 100 OPG	N=5
(2) Pool negativo para <i>S. mansoni</i> alta carga	N= 10
(3) Pool positivo para <i>S. mansoni</i> baixa carga $\leq$ 12 OPG	N= 10
(4) Pool curado há um ano	N= 10
(5) Pool positivo para outros helmintos ( <i>Ascaris</i> , <i>Trichuris</i> , <i>Enterobius</i> e ancilistomídeos)	N= 10
(6) Pool reinfectado	N= 10
(7) Branco sem amostra de soro	

### 6.8. Análise Estatística

As informações coletadas e os resultados dos testes realizados foram codificados e posteriormente digitados através de dupla entrada no programa EpiData (versão 3.1). Os arquivos foram comparados e as divergências detectadas foram corrigidas. A análise foi executada utilizando-se os programas GraphPad Prism (Versão 8.02), Open Epi, version 3.03 e STATA (Versão 14, STATACORP).

A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Na fase inicial foi realizada a análise exploratória dos dados por meio da análise gráfica e da obtenção de medidas-resumo. Para as variáveis contínuas realizou-se cálculos para obtenção de médias, desvios-padrão e medianas acompanhadas dos quartis 1 e 3. No caso de dados não-paramétricos os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados, com valor de  $p \leq 0,05$  considerado significativo.

O “teste referência” foi estabelecido como a soma do número de positivos encontrados em qualquer método parasitológicos de fezes (Gradiente salino, Helmintex® e 18 lamina de Kato-Katz coletadas por três dias consecutivos), e esse valor foi utilizado como referência para análise de desempenho dos métodos sorológicos avaliados. A prevalência global da infecção por *S. mansoni* na área endêmica foi calculada pelo número de indivíduos positivos definidos pelo “teste referência”, dividido pelo número total de participantes. Para comparar o desempenho e a acurácia entre os testes, foram utilizadas medidas de acurácia (sensibilidade,

especificidade, Valor preditivo Positivo - VPP e Valor Preditivo Negativo – VPN). Para avaliar o grau de concordância entre os diferentes métodos, foi calculado o índice kappa ( $\kappa$ ), que varia de 0 a 1,0, sendo considerado sem concordância se  $\kappa < 0,01$ ; ruim se  $0,01 \leq \kappa \leq 0,20$ ; fraco se 0,21 a 0,40; moderado se  $0,41 \leq 0,60$ ; bom se  $0,61 \leq \kappa \leq 0,80$  e excelente concordância se  $\kappa > 0,81$  (LANDIS & KOCH, 1977).

Análises de correlação e regressão foram realizadas utilizando-se OPG de 6 lamina de Kato-Katz frente a reatividade relativa das subclasses. Para a análise comparativa da resposta humoral nos tempos zero e 12 meses foi utilizado o teste T com o pós-teste de Spearman, para avaliar se as diferenças encontradas são significativamente estatísticas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Caracterização da população de estudo

A população utilizada neste estudo foi inicialmente avaliada em um estudo investigativo, que levantou a prevalência de infecções parasitárias por diferentes técnicas parasitológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2018). No presente estudo foram incluídos 187 residentes da comunidade rural de Brejo de Amparo, que concordaram participar do estudo original e que forneceram amostra suficiente de fezes e sangue, sendo 87 mulheres (47,5%) e 100 homens (53,3%). A idade dos participantes deste estudo variou de 6-70 anos, com idade média de 32,4 anos (SD±16,8) e mediana de 31 anos (com intervalo interquartil 17-47 anos), com distribuição homogênea nas diferentes faixas etárias. A população residente em Brejo do Amparo é caracterizada como uma população de baixa renda e escolaridade, onde cerca de 90% dos indivíduos adultos recebem até um salário mínimo e quase 80% possuem apenas o ensino fundamental ou menos. A principal fonte de água potável é o riacho local (60% das residências) e o esgoto doméstico não recebe tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Utilizando os resultados da combinação de todas as técnicas parasitológicas que foram anteriormente analisados e depositados em banco de dados foi verificado que entre 187 indivíduos analisados neste estudo, 91 (48,6%) indivíduos apresentaram infecção ativa por *S. mansoni*, sendo que 56 (29,94%) apresentavam apenas infecção por *S. mansoni*. A análise também identificou 9 (4,97%) indivíduos eliminando ovos de ancilóstomos, sendo dois destes coinfectados por *S. mansoni* (1,06%); e um (0,4%) de *Strongyloides stercoralis*.

O número médio de ovos de *S. mansoni* em indivíduos infectados, definidos pela leitura de 6 lâminas da técnica de Kato-Katz, foi de 4 OPG. Dentre os 91 indivíduos infectados 66 (72,52%) apresentaram baixa carga parasitária de  $\leq 12$  OPG. Não houve associação estatisticamente significativa entre a prevalência e a intensidade da esquistossomose com sexo ou idade.

Tabela 2 Prevalência de infecção por *Schistosoma mansoni* e de helmintoses intestinais em residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo, no município de Januária, Minas Gerais, Brasil

Espécies de Parasitos	Prevalência Total (n/%)	Monoinfectados (n/%)	Coinfectados <i>S. mansoni</i> (n/%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	91 (48,6%)	56 (29,94%)	-
Ancilostomídeos	9 (4,97%)	7 (3,74%)	2 (1,06%)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1 (0,53%)	1 (0,53%)	0

## 7.2. Reatividade de IgG1, IgG3 e IgG4 ao antígeno SWAP carbonato no soro dos indivíduos da população de estudo

Dos 187 indivíduos testados, 91 foram considerados reativos para sorologia frente ao extrato SWAP-carbonato em todas as subclasses de IgG, apresentando 48,6 % de taxa de positividade.

A figura 7 ilustra a intensidade da reatividade de cada subclasse de IgG testada em relação ao status parasitológico definido pela combinação de técnicas parasitológicas como não infectado por helmintos parasitos, infectados ou co-infectados por *S. mansoni* e infectados com outros helmintos. Foi verificado que a reatividade relativa de IgG1 figura 7A a antígenos do SWAP-carbonato foi estatisticamente maior nos indivíduos com presença de ovos do parasito nas fezes em comparação aos que não eliminavam ovos (negativos). Dentre os 91 pacientes positivos para esquistossomose, somente 18,7% não apresentaram reatividade para IgG1 contra o antígeno; entretanto, o teste também identificou que 51 dos indivíduos parasitologicamente negativos (53,12%) demonstraram IgG1 reativos ao extrato antigenico utilizado. Entre as pessoas infectadas por outros helmintos mas sem esquistossomose, metade (50%) reagiram no teste sorológico.

A reatividade de IgG3 frente ao extrato de verme adulto (SWAP-carbonato) não permitiu diferenciar indivíduos infectados dos não infectados de área endêmica como

evidenciado na figura 7B. Entre os indivíduos que tinham ovos nas fezes, somente quatro (4,39%) não apresentavam IgG3 reativo no soro, mas todos os indivíduos com outras helmintoses e 85,58% dos negativos apresentaram reatividade de IgG3.

A análise de IgG4 figura 7C demonstrou que no grupo de positivos para esquistossomose, 58 (63,7%) apresentaram reatividade para esta subclasse, dentre os indivíduos parasitologicamente negativos 64 (66,6%) não apresentaram reatividade para IgG4. No grupo de outras infecções 5 indivíduos (71%) não obtiveram reatividade sorológica para *S. mansoni*.

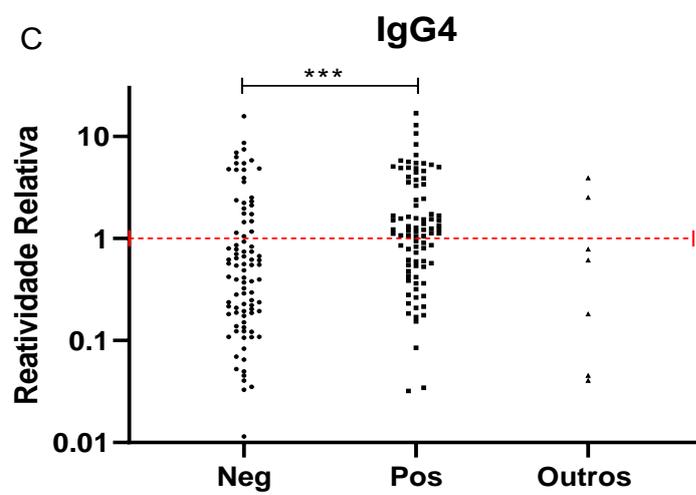
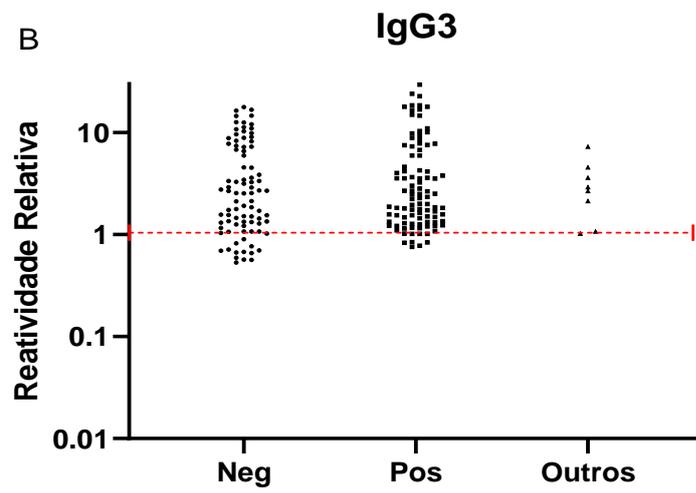
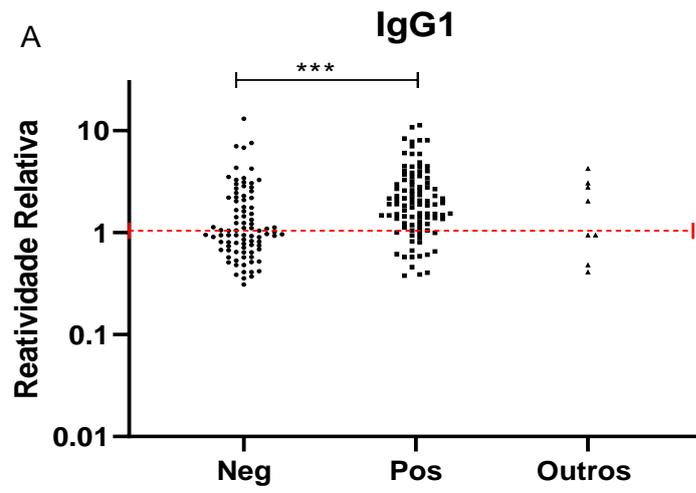


Figura 7. Reatividade relativa de IgG1, IgG3 e IgG4 frente ao antígeno de verme adulto em indivíduos residentes em uma comunidade rural de Brejo do Amparo, Januária – MG, classificados parasitologicamente como negativos, infectados por *S. mansoni* ou infectados por outros helmintos. A identificação da presença de ovos de helmintos nas fezes foi obtidas após o exame de 18 lamínas de Kato-Katz, 2 lamínas de sedimentação espontânea, 500mg de fezes examinadas no Gradiente Salino e 30 g de Helmintex. No grupo de negativos (n= 95), positivos (n= 92), outros helmintos (n= 8). Valores de  $P < 0,05$  são considerados estatísticos.

Entre os isotipos avaliados, a reatividade de IgG1 foi capaz de identificar como positivos 74 indivíduos (39,6% de prevalência). Em comparação com o “teste referência”, este teste mostrou uma sensibilidade de 81,32% e especificidade de 46,8%, e o valor de concordância (Kappa 0.27) que é considerado moderado, como demonstrado na (Tabela 3). A reatividade de IgG3 ao antígeno de *S. mansoni* testado foi a que apresentou a maior sensibilidade como ferramenta de diagnóstico para esquistossomose em área de baixa carga parasitológica, identificando 87 indivíduos reativos para esquistossomose (46,5% de prevalência). Conforme ilustrado na (Tabela 4), a reatividade de IgG3 apresentou uma sensibilidade 95,6%, porém especificidade de 14,5% e um valor de concordância (Kappa 0.099) sendo considerado ruim. Baseado na reatividade de IgG4 53 indivíduos foram considerados positivos para esquistossomose (prevalência de 28%). Foi verificada uma sensibilidade de 58% e especificidade de 71%, e um valor moderado de (Kappa 0.3) (Tabela 5).

Tabela 3 Desempenho da técnica de ELISA para detecção de IgG1 reativa a antígenos de *S. mansoni* em comparação com o “teste referência”.

<b>Acurácia diagnóstica frente a IgG1</b>	
<b>Verdadeiramente positivos</b>	74
<b>Falsos negativos</b>	17
<b>Verdadeiramente negativos</b>	45
<b>Falsos positivos</b>	51
<b>Prevalência (%)</b>	35
<b>Sensibilidade (IC 95%)</b>	81.32 (72.1, 88)
<b>Especificidade (IC 95%)</b>	46.88 (37.21, 56.78)
<b>Valor preditivo positivo (%)</b>	59.2 (50.43, 67.42)
<b>Valor preditivo negativo</b>	72.58 (60.41, 82.12)
<b>Kappa (IC 95%)</b>	0.2792 (0.1455 - 0.4129)

Tabela 4 Desempenho da técnica de ELISA para detecção de IgG3 reativa ao antígeno de *S. mansoni* em comparação com o “teste referência”.

<b>Acurácia diagnóstica frente a IgG3</b>		
<b>Verdadeiramente positivos</b>	87	
<b>Falsos negativos</b>	4	
<b>Verdadeiramente negativos</b>	14	
<b>Falsos positivos</b>	82	
<b>Prevalência (%)</b>	46,5	
<b>Sensibilidade (IC 95%)</b>	95.6	(89.24, 98.28)
<b>Especificidade (IC 95%)</b>	14.5	(8.89, 23)
<b>Valor preditivo positivo (%)</b>	51.48	(44, 58.9)
<b>Valor preditivo negativo</b>	77.78	(54.78, 91)
<b>Kappa (IC 95%)</b>	0.09965	(0.01692 - 0.1824)

Tabela 5 Desempenho da técnica de ELISA para detecção de IgG4 reativa ao antígeno de *S. mansoni* em comparação com o “teste referência”.

<b>Acurácia diagnóstica frente a IgG4</b>	
<b>Verdadeiramente positivos</b>	53
<b>Falsos negativos</b>	38
<b>Verdadeiramente negativos</b>	64
<b>Falsos positivos</b>	27
<b>Prevalência (%)</b>	28
<b>Sensibilidade (IC 95%)</b>	58.2 (47.98, 67.84)
<b>Especificidade (IC 95%)</b>	71.8 (62.17, 79.8 )
<b>Valor preditivo positivo (%)</b>	66.2 (55.36, 75.6 )
<b>Valor preditivo negativo</b>	64.4 (55.06, 72.9 )
<b>Kappa (IC 95%)</b>	0.3021 (0.1598 - 0.4444)

Com o intuito de melhor avaliar a sensibilidade do teste sorológico na identificação de indivíduos com baixa carga parasitária, o grupo de pessoas infectadas foi dividido pela carga parasitária. A reatividade de IgG1 frente a SWAP-carbonato foi estatisticamente mais elevada que os negativos em todos grupos de infectados por *S. mansoni* independentemente de carga figura 8A. Além disto, o teste identificou todos os indivíduos que apresentaram mais de 100 ovos/g fezes, enquanto dos indivíduos que eliminavam entre 13-99 ovos/g fezes somente 4 não foram reativos. Dentre os 64 indivíduos que eliminavam menos que 12 OPG, que conseqüentemente não são identificados com 2 lamínas de Kato-Katz, somente 16 pessoas (25%) não apresentaram reatividade.

IgG3 não apresentou diferença estatística entre os grupos testados como ilustrado na figura 8B, dentre os indivíduos negativos foram classificados corretamente apenas 14 (14,58%) não obtiveram reação no teste sorológico. Dentre o grupo de positivos que eliminavam até 12 OPG 4 (6,25%) não apresentaram reatividade para a subclasse, enquanto no grupo que eliminavam entre 13-99 ovos todos apresentaram reatividade. A análise de pacientes que eliminavam  $> 100$  opg revela que apenas um indivíduo (7,14%) não apresentou reatividade para IgG3.

A reatividade de IgG4 figura 8C entre indivíduos infectados com diferentes cargas parasitárias revela que somente 22 (34,4%) dos indivíduos que eliminavam até 12 opg não demonstraram reatividade. A análise do grupo que eliminava entre 13-99 ovos demonstrou que metade destes indivíduos foram reativos, mas cerca de 35% dos indivíduos com moderada carga parasitária ( $> 100$  opg) não foram considerados reativos para IgG4. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os grupos de negativos frente aos grupos de indivíduos com até 12 OPG e maiores de 100 OPG.

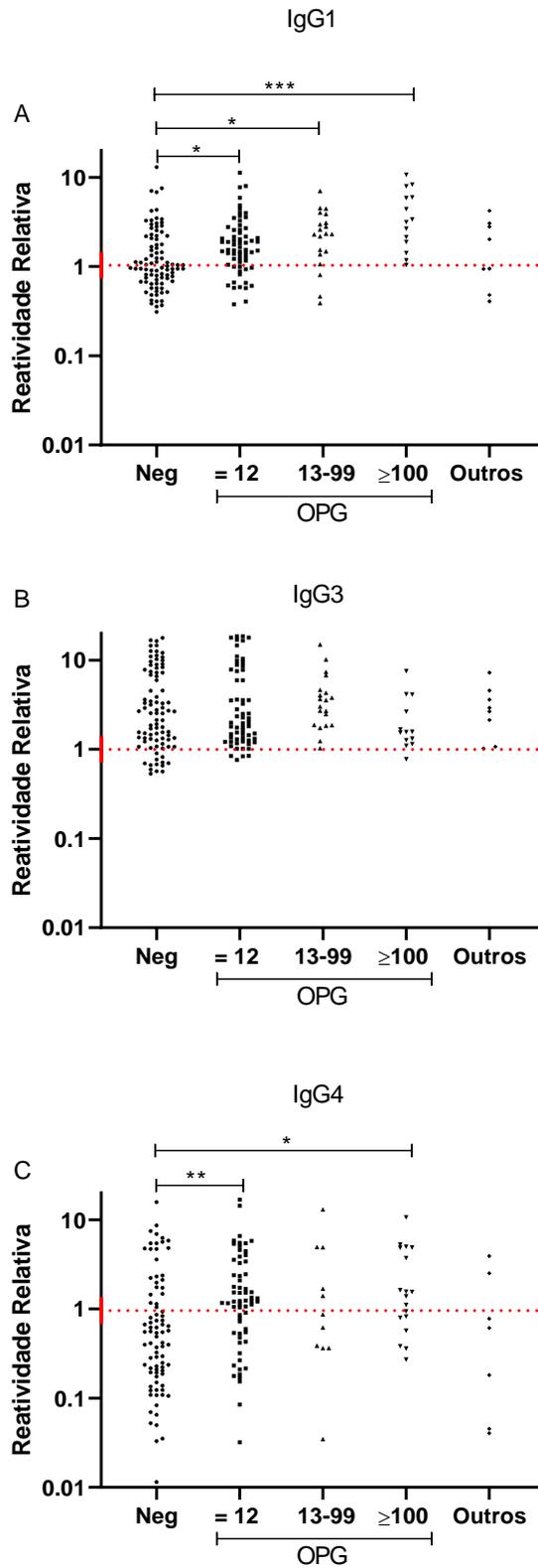


Figura 8. Análise da reatividade relativa de subclasses de IgG1, IgG3 e IgG4, frente a diferentes cargas parasitárias encontradas na comunidade rural de Brejo do Amparo, distrito de Januária (MG). O grupo de positivos parasitologicamente foi subdividido em função das

cargas parasitárias encontradas, sendo  $\leq 12$  OPG, 13-99 e  $\geq 100$ . Sendo no grupo de negativos (n= 95),  $\leq 12$  OPG (n= 64), 13-99 OPG (n= 13) e  $\geq 100$  (n= 15). Foram considerados estatísticos os valores de  $P < 0,05$ .

Para analisar se a carga parasitária pode interferir nos ensaios de ELISA, foram feitas análises de correlação e regressão. Para tanto, os indivíduos positivos no “teste referência” foram testados, utilizando-se o OPG obtido de seis lâminas de Kato-Katz frente os valores de reatividade relativa obtidos. As análises de correlação e regressão linear demonstraram que o nível de reatividade de IgG1 apresentou baixa correlação com a carga parasitária ( $R= 0.34$ ), como demonstrada na figura 9A. IgG3 ( $R= 0.04$ ) e IgG4 ( $R=0.11$ ) não demonstraram correlação com a carga parasitária, respectivamente figura 9B e C.

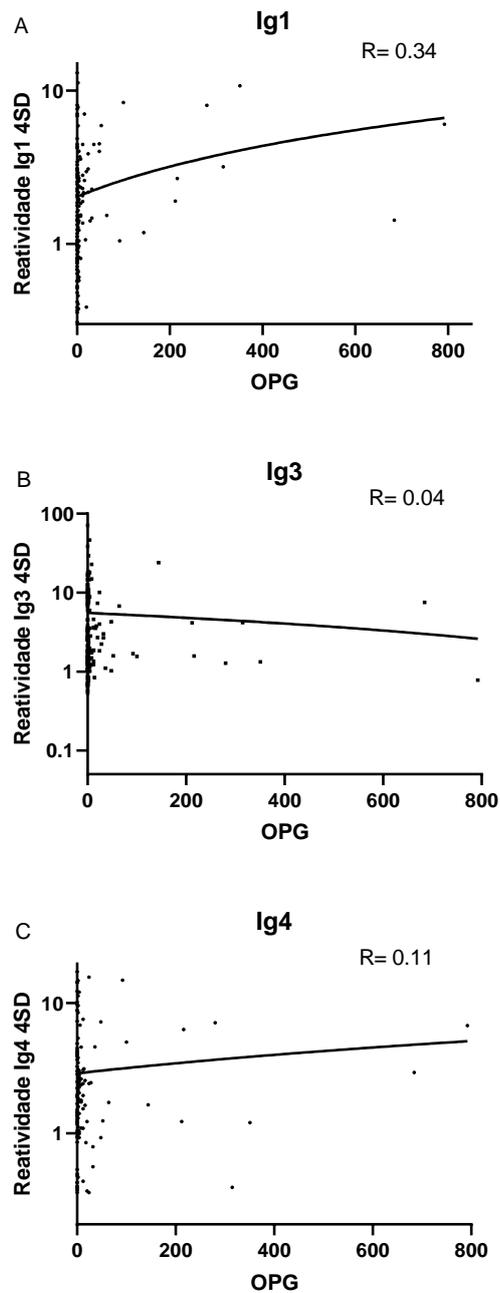


Figura 9. Análise de correlação e regressão linear para verificar possível associação entre reatividade relativa das subclasses de IgG1, IgG3 e IgG4 de indivíduos positivos parasitológicamente (n= 92) frente a carga parasitária da população da comunidade rural de Brejo do Amparo, distrito de Januária (MG).

### **7.3. Reatividade de subclasses de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4) a SWAP-carbonato em indivíduos infectados e curados.**

Os indivíduos com ovos de *S. mansoni* nas fezes foram tratados e reavaliados 12 meses após tratamento com Praziquantel. Dos 91 indivíduos que estavam infectados por *S. mansoni*, 64 participaram do estudo após 12 meses, sendo que 44 (68,75%) continuaram parasitológicamente negativos e 20 (31,25%) se reinfectaram no período. A avaliação da resposta humoral no soro dos indivíduos que permaneceram sem infecção por 12 meses revelou que, apesar de muitos indivíduos apresentarem reatividade de IgG1 diminuída em relação ao tempo inicial, a maioria demonstraram aumento significativo (\*) do nível de reatividade de IgG1 ( $P= 0,0196$ ) um ano após o tratamento figura 10A. A reatividade de IgG3 demonstrada na figura 10B e de IgG4 figura 10C a antígenos de SWAP-carbonato nos indivíduos que foram tratados, curados e permaneceram sem infecção por 1 ano obtiveram variações individuais, mas os grupos apresentaram redução significativa de reatividade, com mediana abaixo da linha de positividade ao final do período.

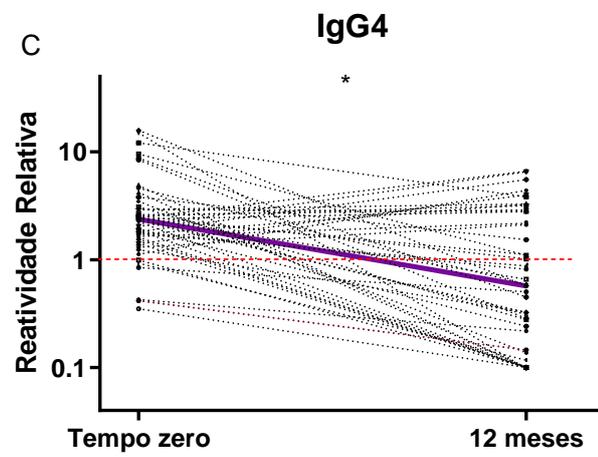
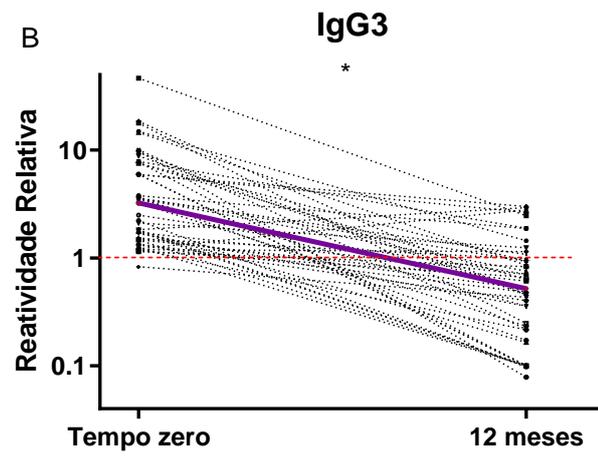
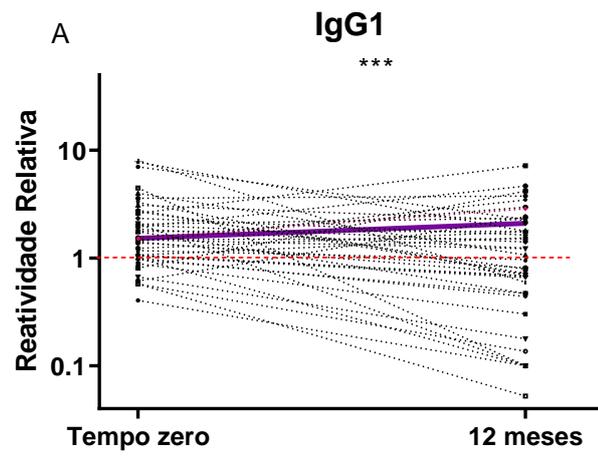


Figura 10. Evolução da resposta humoral das subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 em indivíduos tratados e curados por um ano, nos soros dos indivíduos da comunidade rural de Brejo do Amparo, distrito de Januária (MG). Foram utilizados as reatividades relativas de todos os indivíduos que se encaixaram nesta seleção (n= 42). A linha vermelha representa o cut off e a roxa demonstra a mediana do grupo.

#### **7.4. Análise do perfil eletroforético do extrato antigênico total de verme adulto de *S. mansoni* extraído em tampão carbonato**

O perfil eletroforético do extrato antigênico proteico de verme adulto (SWAP-carbonato), ilustrado na figura 11, revela grande diversidade de proteínas, com inúmeras bandas proteicas, variando de peso molecular superiores a 220KDa até inferiores a 12KDa. A análise do gel demonstra a existência de 6 bandas proeminentes nas faixas de 70KDa, bem como 67, 49, 42, 33 e 18, sendo que esta faixa possui o maior número de bandas componentes do antígeno SWAP carbonato.

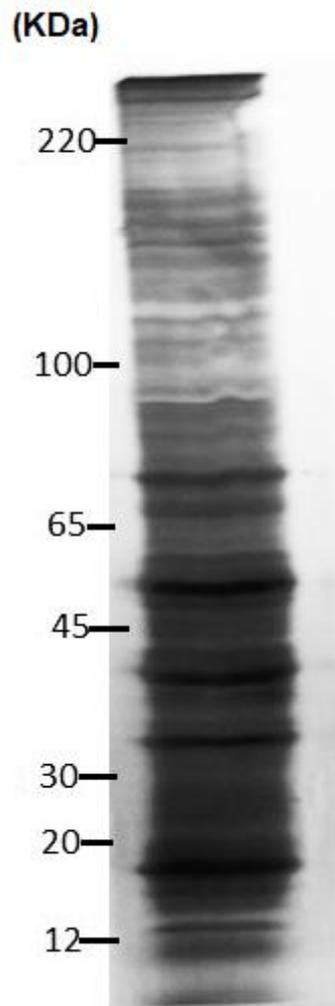


Figura 11. Verificação do perfil eletroforético do extrato antigênico SWAP-carbonato em gel de poliacriladima 10% corado pela coloração rápida de prata.

### 7.5. Avaliação das bandas reativas específicas para o diagnóstico de *S. mansoni*

Para analisar as principais proteínas do extrato SWAP-carbonato reconhecidas por IgG1 e IgG4 presentes em soros dos residentes de Brejo do Amparo foi realizada a técnica de Wester Blot. Como ilustrado na figura 12, foi verificado bandas de reatividade contra IgG1 na faixa de 60 e 100kDa com soro de todos os indivíduos testados, independente da infecção por *S. mansoni*. Também foi observado que IgG1 do soro de indivíduos infectados com alta carga, curados e reinfectados reagem a um conjunto de proteínas com peso molecular entre 150-180 kDa, que não estão presentes nos grupos de negativos. Este conjunto de proteínas também foram reconhecidos com

menor intensidade por indivíduos infectados por *S. mansoni* com baixa carga parasitária, mas também no soro de indivíduos por outros helmintos. IgG1 do soro de indivíduos infectados com alta carga parasitária e os re-infectados também apresentam reatividade a proteínas de aproximadamente 30 e 58 kDa, enquanto que IgG1 do soro de indivíduos curados reagiram com proteínas de aproximadamente 15 e 75k, Da que não estão evidenciadas em outros grupos.

A reatividade de IgG4 do soro de indivíduos residentes em Brejo do Amparo com diferentes *status* parasitológicos encontra-se ilustrada na figura 13. IgG4 do soro dos indivíduos testados reconhecem com pouca intensidade proteínas de aproximadamente 45 kDa, independentemente de estarem infectados com *S. mansoni*. Entretanto, proteínas na faixa de 100 kDa e entre 150-180 kDa foram especificamente reveladas por soro de indivíduos infectados ou reinfectedos por *S. mansoni*, sendo de menor intensidade em indivíduos infectados com baixa carga parasitária e mais intensa no grupo de reinfectedos. Também é possível observar que o grupo de indivíduos reinfectedos apresentam mais duas bandas imunogênicas quando comparado aos outros grupos, com reatividade em aproximadamente 33 e 65KDa.

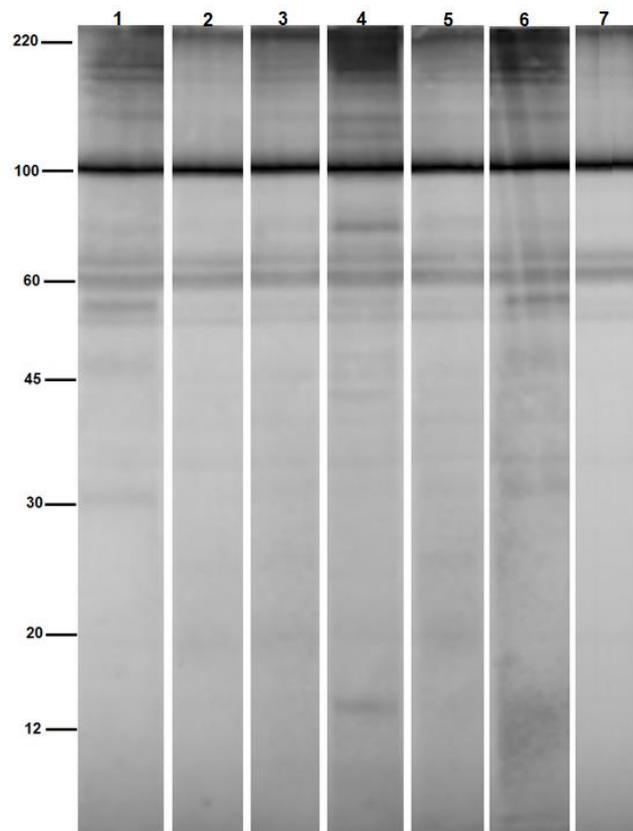


Figura 12. Identificação das principais proteínas do antígeno SWAP-carbonato de reconhecimento frente à subclasse IgG1 utilizando o antígeno SWAP-carbonato (1mg). Foram testados pools de soros de indivíduos (1) positivos para *S. mansoni* com > 100 OPG (n= 5), (2) negativos para qualquer parasitose (n= 10), (3) infectados por *S. mansoni* com < 100 OPG baixa carga (n= 10), (4) curados há um ano (n= 10), (5) infectados com outros helmintos (n= 10), (6) reinfectados (n= 10) e (7) branco controle (sem soro).

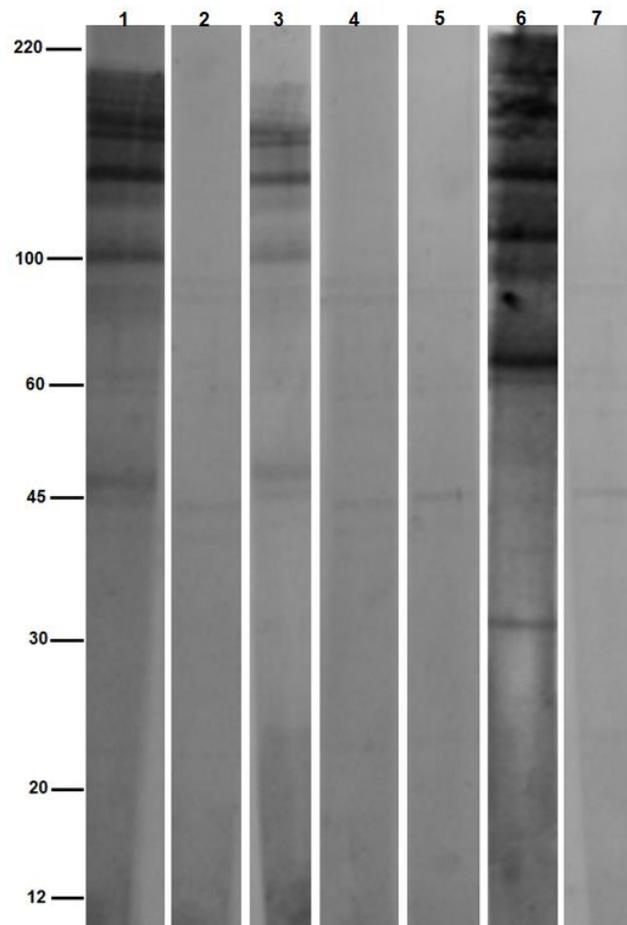


Figura 13. Identificação das principais proteínas do antígeno SWAP-carbonato (1mg) de reconhecimento frente à subclasse IgG4 utilizando o antígeno SWAP-carbonato. Foram testados pools soro de indivíduos (1) positivos para *S. mansoni* com > 100 OPG (n= 5), (2) negativos para qualquer parasitose (n= 10), (3) infectados por *S. mansoni* com < 100 OPG baixa carga (n= 10), (4) curados há um ano (n= 10), (5) infectados com outros helmintos (n= 10), (6) reinfectados (n= 10) e (7) branco controle (sem soro).

## 8. DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante de grande impacto na saúde pública, sendo que o sucesso das estratégias de controle depende da identificação correta dos indivíduos infectados. Vários estudos demonstram que o exame coproscópico utilizando a técnica de Kato-Katz como ferramenta de diagnóstico, que é a técnica recomendado pela Organização Mundial de Saúde, não é suficientemente sensível para detectar indivíduos infectados com baixa carga parasitária, que é a situação das endêmicas do Brasil (DE VLAS & GRYSSELS, 1992; BERHE *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA-MORAES *et al.*, 2019). BARRETO *et al.* (1990), RABELO (1994), SIQUEIRA *et al.* (2011) e SILVA-MORAES *et al.*, (2019). Desta forma faz-se necessário o desenvolvimento e validação de ferramentas mais sensíveis de diagnóstico da esquistossomose que permita atingir o controle da transmissão desta helmintose nas áreas endêmicas, que é a atual meta da OMS que visa o desenvolvimento de ações para a eliminação da esquistossomose, baseados em diagnóstico e tratamento dos infectados. Técnicas que visam o imunodiagnóstico da esquistossomose, incluindo a utilização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), podem ser uma alternativa para esta situação, visto que as infecções por *Schistosoma* são altamente imunogênicas, e a presença de anticorpos anti-*Schistosoma* ou a resposta imunológica mediada por células é facilmente demonstrada em indivíduos infectados (DOENHOFF *et al.*, 2004). A maioria dos testes de ELISA avaliados até o momento utilizam extrato bruto de verme ou ovo do parasito para detectar a reatividade de IgM ou IgG nos indivíduos e comparam o resultado obtido com os dados parasitológicos já definidos como pouco sensíveis e concluem que estes ensaios, apesar de sensíveis são pouco específicos (RABELLO *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2013). Na tentativa de contribuir para uma avaliação mais adequada da acurácia diagnóstica de testes sorológicos baseados em ELISA, o presente estudo utilizou, como antígeno, o extrato de verme adulto utilizado em intradermoreação, que ainda não havia sido testado em testes imunoenzimático, e escolheu avaliar a reatividade de diferentes subclasses de IgG. Outra importante característica do estudo foi que a validação diagnóstica realizada avaliou uma população de área endêmica, e não coleção de soros de indivíduos com diagnóstico bem definido, cuja população apresentava baixa carga parasitária e frequentes reinfecções e a confirmação do *status* parasitológico foi realizada por uma combinação de testes parasitológicos, a citar: 18 lamínas de Kato-Katz, gradiente salino e

Helmintex, permitindo identificar indivíduos com baixa carga parasitária (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Neste trabalho, foi verificado que o ELISA SWAP-carbonato anti-IgG1 conseguiu diagnosticar corretamente 74, dos 91 indivíduos, que possuíam infecção ativa para *S. mansoni*, possuindo a melhor sensibilidade dentre as subclasses testadas. Entretanto, esta imunoglobulina apresentou baixa especificidade (sensibilidade 81,32%, especificidade 46,88% e kappa 0,27) e a presença de IgG1 reativo ao parasito permaneceu elevada mesmo após um ano da cura parasitológica. Nossos dados também revelam que IgG3 foi reativo no soro de 87, dos 91 indivíduos infectados (sensibilidade de 95,6%); entretanto esta subclasse teve reatividade elevada em praticamente todos os grupos de indivíduos, independente do seu *status* parasitológico, obtendo a pior acurácia diagnóstica (especificidade de 14,5% e kappa 0,09), demonstrando que esta subclasse não é capaz de diferenciar os indivíduos negativos dos positivos. A subclasse IgG4 apresentou a melhor especificidade diagnóstica, identificando corretamente 53 indivíduos que possuíam infecção ativa por *S. mansoni* apresentando sensibilidade de 58,2%, especificidade 71,8% e a melhor concordância entre os testes parasitológicos e sorológicos com kappa moderado 0,30. Variação da reatividade de diferentes subclasses de IgG durante a infecção por *Schistosoma* foi também relatada por BOCTOR *et al.*, (1990) em soros de uma população de área endêmica no Egito. Neste estudo os autores relataram que dentre as subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgG1 e IgG3 eram as subclasses mais abundantes nos soros de indivíduos infectados, enquanto IgG4 apresentou as menores reações. Entretanto, estas variações não foram relacionadas com diagnóstico. Outros estudos de base populacional também foram realizados com o intuito de testar a eficácia da sorologia como ferramenta de diagnóstico para infecção por *S. mansoni*. FROTA *et al.*, (2010) realizaram um estudo de comparação diagnóstica entre reatividade de IgG aos antígenos de ovo de *S. mansoni* (SEA) e o método Kato-Katz na comunidade rural de Caititú no Estado do Ceará, com população estimada de 317 habitantes, dos quais 305 indivíduos participaram do estudo. Em uma primeira análise, onde foram comparados os resultados de três lâminas de Kato-Katz com a sorologia, foi verificado que 85 indivíduos reativos sorologicamente eram parasitológicamente negativos; entretanto, ao se aumentar o número de lâminas examinadas nestes indivíduos sorologicamente positivos todos apresentaram ovos nas fezes. Os autores concluíram que nesta área a sorologia teve sensibilidade de 100% e especificidade 72,9%.

Também foram avaliados neste estudo a infecção por outras espécies de helmintos como *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* e ancilostomídeos. Posteriormente, GONÇALVES *et al.*, (2006) realizou um estudo conduzido em Paracambi (RJ) realizou três coletas de material fecal em dias alternados para confeccionar 6 laminas de Kato-Katz duas por amostra, sendo incluídos 269 indivíduos. Foi verificado que 17 (6,7%) indivíduos foram considerados parasitologicamente positivos por apresentarem ovos de *S. mansoni* nas fezes. Todos os indivíduos positivos apresentavam baixa carga parasitária, sendo a média total de 5,5 OPG. Nesta população, 128 (48%) indivíduos foram reativos sorologicamente para IgG, uma prevalência estimada que foi cerca de 7 vezes maior que a obtida com os exames de fezes. Esta discrepância entre as técnicas não é bem elucidada, podendo estar associada a uma reação inespecífica da sorologia, por uma resposta subestimada da técnica de Kato-Katz na população de baixa carga parasitária ou memória imunológica.

Mais recentemente, GRENFELL *et al.*, (2013) conduziram um estudo nas comunidades rurais de Buriti Seco e Morro Grande, no município de Montes Claros - Minas Gerais, onde 40 indivíduos, com idades variando de 28-64 anos, participaram do estudo e os autores incluíram mais 20 soros de indivíduos negativos, com sexo e idade pareados, como controle. Foram realizadas quatro coletas para material fecal em dias consecutivos e uma amostra de sangue para obtenção de soro. As fezes foram processadas para confecção de 18 laminas de Kato-Katz e as amostras de soros testados pela técnica de ELISA IgG, utilizando aos antígenos SEA e SWAP. Foi observado que SEA obteve sensibilidade de 85%, especificidade 80% e kappa 0,75 e o antígeno SWAP 90% de sensibilidade e especificidade, possuindo kappa de 0,85, considerado excelente. Apesar da excelente acurácia obtida com o teste sorológico utilizado neste estudo, é importante salientar que os indivíduos negativos foram selecionados fora da área endêmica.

Nossos dados também revelaram que, apesar do aumento da sensibilidade dos testes sorológicos em relação à técnica de Kato-Katz, ainda foi verificado que 17 indivíduos infectados foram não reativos para IgG1, 4 foram não reativos para IgG3 e 38 não reativos para IgG4, e estes indivíduos apresentam geralmente baixa carga parasitária.

Para melhor caracterizar os indivíduos que não apresentaram ovos nas fezes, mas foram reativos na sorologia, foi avaliado a taxa de infecção por outros helmintos, a taxa de reinfecção na população de estudo e a permanência de anticorpos reativos

um ano após o tratamento. Entre os 187 indivíduos de distrito de Brejo do Amparo avaliados menos que 6% apresentaram outras helmintoses, assim reação cruzada com outros helmintos não justifica a taxa de reatividade encontrada nos indivíduos definidos como não infectados neste estudo. Entretanto, entre os poucos indivíduos com outras helmintoses, mas sem infecção por *S. mansoni*, IgG1 reagiu com 50% deles, enquanto a reatividade de IgG4 foi mais específica neste grupo. Por outro lado, a área avaliada tem alta taxa de reinfecção, sendo verificado que entre os indivíduos tratados e curados avaliados neste estudo mais de 31% se reinfecou em um período de um ano. Assim é possível que alguns indivíduos reativos do grupo negativo estivessem em período pré-patente de infecção. Dos 96 indivíduos negativos no tempo zero, 15 se apresentaram infectados no tempo 12 meses, destes 11 apresentaram reatividade para IgG1 inicialmente, IgG3 apresentou reatividade para 14 indivíduos e IgG4 demonstrou reação para 13 pessoas, sugerindo que a técnica de ELISA possa ter identificado indivíduos em período pré-patente de infecção. Outra possibilidade para justificar a reatividade observada no grupo de indivíduos reativos, mas negativos para ovos nas fezes seria a permanência destes anticorpos após a cura parasitológica. SILVA-MORAES *et al.*, (2019) demonstraram que indivíduos negativos parasitológicamente podem variar a resposta de anticorpos para *S. mansoni*, onde os indivíduos negativos de área endêmica são mais reativos que os de área não endêmica. RABELLO *et al.*, (1995) acompanharam por 2 anos 25 indivíduos parasitológicamente diagnosticados com esquistossomose que foram tratados; do total de pacientes apenas 72% apresentaram cura parasitológica. Os níveis de IgG foram mensurados em diferentes tempos: tempo zero (pré-tratamento), aos dois meses, 6 e 24 meses após tratamento. A diminuição dos níveis de anticorpos IgG na maior parte dos indivíduos foi observada somente 24 meses após o tratamento, não sendo observada diferença entre os tempos dois e 6 meses.

No presente estudo, verificamos que IgG1 permanece elevada após 1 ano de tratamento, mas IgG3 e IgG4 apresentam redução significativa, podendo assim representar melhor infecções ativas. A redução seletiva de alguns isotipos de anticorpos específicos após o tratamento também foi relatada por BOCTOR *et al.*, (1990) realizando análise cinética de subclasses de IgG em soro de pacientes curados (quatro semanas, 6 semanas e 12 semanas) após tratamento. Os autores demonstraram que dentre as três subclasses IgG1, IgG3 e IgG4, os isotipos IgG1, IgG3 obtiveram aumento de reação após o tratamento, com leve diminuição dos anticorpos após 6 e 12

semanas, enquanto IgG4 que obteve uma queda mais acentuada sendo estatisticamente significativa.

A avaliação de correlação entre carga parasitária e níveis das subclasses de IgG1, IgG3 e IgG4 foi realizada, demonstrando que a reatividade IgG1 possui fraca correlação entre carga parasitária e reatividade  $R= 0,34$ , enquanto IgG3 e IgG4 não demonstraram correlação. GRENFELL *et al.*, (2012) demonstrou através de modelos murinos, correlações positivas entre os níveis de IgG e número de vermes recuperados através da perfusão do sistema porta. Entretanto, estudos populacionais utilizando antígenos de ovos de *S. mansoni* não apresentaram correlação positiva entre níveis de anticorpos IgG total e carga parasitária, especialmente indivíduos com baixa carga parasitária residentes em áreas endêmicas (NEGRÃO-CORREA *et al.*, 2014; SILVA-MORAES *et al.*, 2019).

O perfil eletroforético do antígeno SWAP carbonato demonstrou um expressivo número de bandas constituintes desde superiores a 220KDa a inferiores de 12kDa, onde a maior quantidade de bandas foi observada entre as faixas de 80-15kDa. A identificação de bandas reativas para as subclasses IgG1 e IgG4 no pool de soro de indivíduos com diferentes *status* parasitários revela que IgG1 reage contra uma banda específica para a infecção por *S. mansoni* na faixa de aproximadamente 57kDa presente em grupos de infectados com alta carga e dos reinfectados. IgG4 apresentou uma resposta mais específica à infecção ativa por *S. mansoni*, onde os grupos de infectados com alta carga e reinfectados obtiveram os maiores números de bandas reativas que foram específicas para infecção, especialmente proteínas de aproximadamente 60kDa, 47kDa e 33KDa. Na faixa de 220-100kDa, é possível visualizar duas bandas reativas que demonstraram a maior especificidade no diagnóstico da infecção ativa por *S. mansoni* se mostrando antigênicas independentemente da carga parasitária, que podem ser futuramente exploradas para desenvolvimento de testes imunológicos mais específicos e que identifique baixa carga parasitária.

Trabalhos que visam identificar biomarcadores antigênicos específicos para infecção ativa por *S. mansoni* demonstraram através da técnica de eletroforese 1D utilizando-se o extrato SWAP fosfato a presença de uma banda específica de 22kDa em soros de coelhos infectados (DUNNE *et al.*, 1997). Em população humana, SULAHIAN *et al.*, (2005) investigando o perfil de reconhecimento para 58 indivíduos infectados por *S. mansoni* utilizando-se da técnica de eletroforese 1D demonstrou seis bandas reativas

específicas nos soros de indivíduos infectados nas faixas de 120, 110, 95, 80, 70 e 6kDa. VALLI *et al.*, (1999) utilizando a técnica de imunoblot frente ao extrato antigênico SWAP extraído em tampão fosfato em soros de indivíduos com diferentes perfis parasitológicos, demonstrou o reconhecimento de um banda na altura de 30 KDa, que se referem as proteínas Sm31/32, principalmente, em indivíduos de fase aguda, neste trabalho, as análises de IgG1 e IgG4 demonstraram o reconhecimento de uma banda na faixa de 30 KDa, onde as duas imunoglobulinas reconheceram esta banda em indivíduos infectados com > 100 OPG, adicionalmente IgG4 também reconheceu esta banda em indivíduos reinfetados, sugerindo a possibilidade desta banda ser utilizada para identificar indivíduos com altas cargas parasitárias ou em reinfecção. A técnica de eletroforese 2D tem sido empregada em estudos recentes na tentativa de buscar alvos diagnósticos ainda mais específicos para a infecção por *Schistosoma* SILVA-MORAES *et al.*,(2019) utilizando pools de soros de pacientes infectados e não infectados por *S. mansoni* em área endêmica de Minas Gerais com baixa carga parasitária detectaram uma proteína na faixa de 43kDa que demonstrou bom desempenho no diagnóstico de indivíduos infectados, entretanto, a proteína apresentou reatividade em grande parte dos indivíduos negativos de área endêmica, demonstrando a necessidade de investimentos na busca de novos antígenos com potencial uso no diagnóstico da esquistossomose mansoni.

## 9. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que dentre as subclasses de IgG avaliadas (IgG1, IgG3 e IgG4), IgG3 apesar de apresentar a maior sensibilidade possuiu a pior acurácia diagnóstica, não sendo capaz de diferenciar indivíduos positivos e negativos, IgG1 apresentou boa sensibilidade de 85% sendo a imunoglobulina mais sensível para detectar a infecção ativa por *S. mansoni*, sendo capaz de diagnosticar todos os indivíduos que possuíam ao menos 100 OPG e 75% dos indivíduos que possuíam baixa carga parasitária  $\leq 12$  OPG entretanto apresentou baixa especificidade 46,88%, esta subclasse um ano após tratamento demonstrou aumento de reatividade frente o extrato SWAP-carbonato. IgG4 apresentou menor sensibilidade 58,2% diagnosticando corretamente 53 indivíduos, entretanto foi a subclasse que apresentou a melhor especificidade 71,8% e melhor valor de concordância entre os testes ( $\kappa = 0,30$ ), este isotipo também demonstrou elevada queda de reatividade após um ano de tratamento. As análises de western blot demonstraram que IgG4 foi a subclasse mais sensível para a identificação de bandas reativas específicas para a infecção ativa por *S. mansoni*. Indivíduos infectados com alta e baixa carga parasitária bem como reinfectedos demonstraram o reconhecimento de um conjunto de proteínas de alto peso molecular (150-200KDa) estando presente independente da carga parasitária. Os dados demonstram a possibilidade da realização de um teste diagnóstico que baseia-se na reatividade de isotipos de IgG, sendo mais sensível para o diagnóstico em indivíduos residentes de áreas de baixa transmissão da esquistossomose e que possuam baixas cargas parasitárias.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Adriko, M., C. Standley, *et al.* (2014). "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 tropica **136**: 50-57.
- Amaral, R. S. d., P. L. Tauil, *et al.* (2006). "An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **101**: 79-85.
- Andrade, Z. A. (2008). "Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression." Acta tropica **108**(2-3): 79-82.
- Angeles, J. M. M., Y. Goto, *et al.* (2019). "Detection of canine *Schistosoma japonicum* infection using recombinant thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins." Journal of Veterinary Medical Science **81**(10): 1413-1418.
- Appleby, L. J., N. Nausch, *et al.* (2014). "CD16 expression on monocytes in healthy individuals but not schistosome-infected patients is positively associated with levels of parasite-specific IgG and IgG1." PLoS neglected tropical diseases **8**(8).
- Barreto, M. L., D. Smith, *et al.* (1990). "Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **84**(4): 554-555.
- Berhe, N., G. Medhin, *et al.* (2004). "Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*." Acta tropica **92**(3): 205-212.
- Black, C. L., P. N. Mwinzi, *et al.* (2010). "Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human *Schistosomiasis mansoni*." PLoS neglected tropical diseases **4**(3).
- Blanton, R. E., L. M. Barbosa, *et al.* (2015). "The relative contribution of immigration or local increase for persistence of urban schistosomiasis in Salvador, Bahia, Brazil." PLoS neglected tropical diseases **9**(3).
- Boctor, F. and J. Peter (1990). "IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: overproduction of schistosome-specific and non-specific IgG4." Clinical & Experimental Immunology **82**(3): 574-578.
- Bonnard, P., F. Remoue, *et al.* (2004). "Specific isotype immune response in the diagnosis of human schistosomiasis pathology?" The American journal of tropical medicine and hygiene **71**(2): 202-205.
- Boros, D. L. (1994). "The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma." Immunobiology **191**(4-5): 441-450.
- Boros, D. L. and K. S. Warren (1970). "Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs." The Journal of experimental medicine **132**(3): 488-507.
- Botelho, M., A. C. Ferreira, *et al.* (2009). "*Schistosoma haematobium* total antigen induces increased proliferation, migration and invasion, and decreases apoptosis of normal epithelial cells." International journal for parasitology **39**(10): 1083-1091.
- Boukli, N. M., B. Delgado, *et al.* (2011). "*Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis." The Journal of parasitology **97**(5): 852.
- Brener, Z. and J. Pellegrino (1956). "Method for isolating schistosome granulomas from mouse liver." The Journal of parasitology **42**(6): 564-564.
- Brondyk, W. H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. Methods in enzymology, Elsevier. **463**: 131-147.

- Burke, M., M. Jones, *et al.* (2009). "Immunopathogenesis of human schistosomiasis." Parasite immunology **31**(4): 163-176.
- Burlandy-Soares, L. C., L. C. d. S. Dias, *et al.* (2003). "Schistosomiasis mansoni: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **98**(6): 853-859.
- Butterworth, A. E., D. W. Dunne, *et al.* (1992). "Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms, and implications for control." Immunological investigations **21**(5): 391-407.
- Caldas, I. R., A. C. Campi-Azevedo, *et al.* (2008). "Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection." Acta tropica **108**(2-3): 109-117.
- Caldeira, K., C. F. Teixeira, *et al.* (2012). "Comparison of the Kato-Katz and Helmintex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Paraná, southern Brazil." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **107**(5): 690-692.
- Carvalho, O. d. S., C. L. F. d. Mendonça, *et al.* (2018). "Geographical distribution of intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the states of Parana, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco and Rio Grande do Norte, Brazil, 2012-2014." Epidemiologia e Serviços de Saúde **27**: e2017343.
- Cavalcanti, M. G., L. F. Silva, *et al.* (2013). "Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis." Trends in parasitology **29**(2): 75-82.
- Cheever, A. W., K. F. Hoffmann, *et al.* (2000). "Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men." Immunology today **21**(9): 465-466.
- Chen, R., Y. Zhou, *et al.* (2012). "Correlation between acute schistosomiasis japonica and serum interleukin-33 levels." Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi= Chinese journal of schistosomiasis control **24**(1): 32-34, 39.
- Chernet, A., K. Kling, *et al.* (2017). "Accuracy of diagnostic tests for *Schistosoma mansoni* infection in asymptomatic Eritrean refugees: serology and point-of-care circulating cathodic antigen against stool microscopy." Clinical Infectious Diseases **65**(4): 568-574.
- Chuah, C., G. N. Gobert, *et al.* (2019). "Schistosomiasis in Malaysia: A review." Acta tropica **190**: 137-143.
- Chuah, C., M. K. Jones, *et al.* (2014). "Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology." Trends in parasitology **30**(3): 141-150.
- Coelho, P. M. Z., A. D. Jurberg, *et al.* (2009). "Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **104**(5): 720-723.
- Coelho, P. M. Z., L. M. V. Siqueira, *et al.* (2016). "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 neglected tropical diseases **10**(6).
- Colley, D. and W. Secor (2014). "Immunology of human schistosomiasis." Parasite immunology **36**(8): 347-357.
- Colley, D. G., S. Binder, *et al.* (2013). "A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*." The American journal of tropical medicine and hygiene **88**(3): 426-432.
- Colley, D. G., A. L. Bustinduy, *et al.* (2014). "Human schistosomiasis." The Lancet **383**(9936): 2253-2264.
- Correa-Oliveira, R., L. Malaquias, *et al.* (1998). "Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection." Brazilian journal of medical and biological research **31**(1): 171-177.

- Cosenza, M., E. Barrios, *et al.* (2017). "IgM and IgG responses in *Schistosoma mansoni*-infected mice using egg and worm antigens: Does response vary with parasitic burden and phase of infection?" Experimental parasitology **179**: 36-42.
- Coulibaly, J. T., S. Knopp, *et al.* (2011). "Accuracy of urine circulating cathodic antigen (CCA) test for *Schistosoma mansoni* diagnosis in different settings of Côte d'Ivoire." PLoS neglected tropical diseases **5**(11).
- Coura, J. and R. Amaral (2004). "Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **99**: 13-19.
- Curwen, R. S. and R. A. Wilson (2003). "Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts." Trends in parasitology **19**(2): 63-66.
- da Frota, S. M., T. R. Carneiro, *et al.* (2011). "Combination of Kato–Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil." Acta tropica **120**: S138-S141.
- de Jesus, A. R., A. Silva, *et al.* (2002). "Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni." The Journal of infectious diseases **185**(1): 98-105.
- de Noya, B. A., R. Ruiz, *et al.* (2007). "Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria: the Venezuelan experience." Acta tropica **103**(1): 41-49.
- de Oliveira Barbosa, M., S. A. de Oliveira, *et al.* (2019). "Schistosomicidal and prophylactic activities of phthalimido-thiazoles derivatives on schistosomula and adult worms." European Journal of Pharmaceutical Sciences **133**: 15-27.
- de Sousa, S. R. M., I. H. L. Dias, *et al.* (2019). "Concordance of the point-of-care circulating cathodic antigen test for the diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low endemicity area." Infectious diseases of poverty **8**(1): 37.
- De Vlas, S. and B. Gryseels (1992). "Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences." Parasitology Today **8**(8): 274-277.
- do Espírito-Santo, M. C. C., P. L. Pinto, *et al.* (2014). "Detection of *Schistosoma mansoni* antibodies in a low-endemicity area using indirect immunofluorescence and circumoval precipitin test." The American journal of tropical medicine and hygiene **90**(6): 1146-1152.
- Doenhoff, M., A. Butterworth, *et al.* (1993). "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 **87**(1): 42-48.
- Doenhoff, M. J., P. L. Chiodini, *et al.* (2004). "Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies?" Trends in parasitology **20**(1): 35-39.
- dos Santos Carvalho, O., C. L. F. de Mendonça, *et al.* "Geographical distribution of intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the states of Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco and Rio Grande do Norte, Brazil, 2012-2014."
- Dunne, D. W. and A. Cooke (2005). "A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease." Nature Reviews Immunology **5**(5): 420-426.
- Dunne, D. W. and E. J. Pearce (1999). "Immunology of hepatosplenic *schistosomiasis mansoni*: a human perspective." Microbes and infection **1**(7): 553-560.
- DuVall, A. S., J. K. Fairley, *et al.* (2014). "Development of a specimen-sparing multichannel bead assay to detect antiparasite IgG4 for the diagnosis of *Schistosoma* and *Wuchereria* infections on the coast of Kenya." The American journal of tropical medicine and hygiene **90**(4): 638-645.

- Egesa, M., L. Lubyayi, *et al.* (2018). "Antibody responses to *Schistosoma mansoni* schistosomula antigens." Parasite immunology **40**(12): e12591.
- Elbaz, T. and G. Esmat (2013). "Hepatic and intestinal schistosomiasis." Journal of advanced research **4**(5): 445-452.
- Engels, D., E. Sinzinkayo, *et al.* (1996). "Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications." The American journal of tropical medicine and hygiene **54**(4): 319-324.
- Enk, M. J., A. C. L. Lima, *et al.* (2010). "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 **105**(4): 570-577.
- Enk, M. J., A. C. L. Lima, *et al.* (2008). "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 **108**(2-3): 222-228.
- Espírito-Santo, M. C. C., M. V. Alvarado-Mora, *et al.* (2014). "Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting." BMC infectious diseases **14**(1): 558.
- Everts, B., G. Perona-Wright, *et al.* (2009). "Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses." Journal of Experimental Medicine **206**(8): 1673-1680.
- Fenwick, A., D. Rollinson, *et al.* (2006). "Implementation of human schistosomiasis control: challenges and prospects." Advances in parasitology **61**: 567-622.
- Ferrari, M., P. Coelho, *et al.* (2003). "Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial." Bulletin of the World Health Organization **81**: 190-196.
- Ferreira, F. T., T. A. Fidelis, *et al.* (2017). "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." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **50**(3): 358-364.
- French, M. D., D. Evans, *et al.* (2018). "Schistosomiasis in Africa: Improving strategies for long-term and sustainable morbidity control." PLoS neglected tropical diseases **12**(6).
- Fuss, A., H. D. Mazigo, *et al.* (2018). "Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania." PloS one **13**(8).
- Gause, W. C., T. A. Wynn, *et al.* (2013). "Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths." Nature Reviews Immunology **13**(8): 607-614.
- Gazzinelli, G., F. Ramalho-Pinto, *et al.* (1965). "The intradermal test in the diagnosis of *Schistosomiasis mansoni*. IX. Skin response to a purified fraction isolated from cercarial extracts." The Journal of parasitology: 753-756.
- Gomes, L. I., L. H. Marques, *et al.* (2009). "Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **104**(8): 1194-1196.
- Gonçalves, M. M., M. G. Barreto, *et al.* (2006). "Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination." Acta tropica **100**(1-2): 24-30.
- Gordon, R. and R. Griffiths (1951). "Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae." Annals of Tropical Medicine & Parasitology **45**(3-4): 227-243.

- Grenfell, R., W. Martins, *et al.* (2013). "The schistosomula tegument antigen as a potential candidate for the early serological diagnosis of schistosomiasis mansoni." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **55**(2): 75-78.
- Grenfell, R. F. Q., P. M. Z. Coelho, *et al.* (2014). "Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity." PloS one **9**(1).
- Grenfell, R. F. Q., W. Martins, *et al.* (2013). "*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." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **108**(3): 328-334.
- Grenfell, R. F. Q., W. H. Martins, *et al.* (2012). "Antigens of worms and eggs showed a differentiated detection of specific IgG according to the time of *Schistosoma mansoni* infection in mice." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **45**(4): 505-509.
- Grzych, J.-M., E. Pearce, *et al.* (1991). "Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni." The Journal of Immunology **146**(4): 1322-1327.
- Guegan, H., J. Fillaux, *et al.* (2019). "Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis." PLoS neglected tropical diseases **13**(9): e0007711.
- Hagan, P., U. J. Blumenthal, *et al.* (1991). "Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*." Nature **349**(6306): 243-245.
- Hams, E., G. Aviello, *et al.* (2013). "The schistosoma granuloma: friend or foe?" Frontiers in immunology **4**: 89.
- HEALTH, W. O. F. A. (2010). "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris." [http://www.oie.int/eng/normes/manual/A\\_00082.htm](http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00082.htm).
- HEALTH, W. O. F. A. (2015). "Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2013: Weekly epidemiological record. Geneva, 2015." <http://www.who.int/ctd/schisto/index.html>.
- Hiatt, R. A., Z. R. Sotomayor, *et al.* (1979). "Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni." Journal of Infectious Diseases **139**(6): 659-666.
- Hinz, R., N. G. Schwarz, *et al.* (2017). "Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis—A review." Molecular and cellular probes **31**: 2-21.
- Hotez, P. J., J. M. Bethony, *et al.* (2008). "Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis." Expert Review of Vaccines **7**(6): 745-752.
- Hussein, H. M., M. M. El-Tonsy, *et al.* (2012). "Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum." Parasitology research **111**(1): 475-478.
- Jachowski, L. A. and R. I. Anderson (1961). "Evaluation of some laboratory procedures in diagnosing infections with *Schistosoma mansoni*." Bulletin of the World Health Organization **25**(4-5): 675.
- Jassim, A., K. Hassan, *et al.* (1987). "Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni." Parasite immunology **9**(6): 627-650.
- Jin, Y.-m., K. Lu, *et al.* (2010). "Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis." Clin. Vaccine Immunol. **17**(3): 476-480.
- Kanamura, H. Y., S. Hoshino-Shimizu, *et al.* (1979). "Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni." The American journal of tropical medicine and hygiene **28**(2): 242-248.
- Kardoush, M. I., B. J. Ward, *et al.* (2016). "Identification of Candidate Serum Biomarkers for *Schistosoma mansoni* Infected Mice Using Multiple Proteomic Platforms." PloS one **11**(5).

- Kato, K. and M. Miura (1954). "Comparative examinations Jap J Parasitol 3: 35 (Japanese text). Apud Martin LK, Beaver PC, 1968. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections." Am. J. Trop. Med. Hyg **17**: 382-391.
- KATZ, N. (2018). "Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose Mansonii e Geohelminthoses." Editora Fiocruz.
- Katz, N., A. Chaves, *et al.* (1972). "A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **14**(6): 397-400.
- Katz, N. and S. V. Peixoto (2000). "Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **33**(3): 303-308.
- Kinkel, H.-F., S. Dittrich, *et al.* (2012). "Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis." Clin. Vaccine Immunol. **19**(6): 948-953.
- Knopp, S., J. R. Stothard, *et al.* (2013). "From morbidity control to transmission control: time to change tactics against helminths on Unguja Island, Zanzibar." Acta tropica **128**(2): 412-422.
- Kongs, A., G. Marks, *et al.* (2001). "The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections." Tropical Medicine & International Health **6**(3): 163-169.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambertucci, J. R., L. C. d. S. Silva, *et al.* (2004). "Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **37**(4): 333-337.
- Landis, J. R. and G. G. Koch (1977). "An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers." Biometrics: 363-374.
- Layland, L. E., R. Rad, *et al.* (2007). "Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2." European journal of immunology **37**(8): 2174-2184.
- Lenzi, H. L., A. D. Jurberg, *et al.* (2008). "Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo." Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL., organizadores. Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz: 85-145.
- Lin, D.-D., J.-M. Xu, *et al.* (2008). "Evaluation of IgG-ELISA for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* in a high prevalence, low intensity endemic area of China." Acta tropica **107**(2): 128-133.
- Lindholz, C. G., V. Favero, *et al.* (2018). "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 neglected tropical diseases **12**(3).
- Ludolf, F., P. R. Patrocínio, *et al.* (2014). "Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome." PLoS Negl Trop Dis **8**(3): e2745.
- Lunde, M. N. and E. A. Ottesen (1980). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis." The American journal of tropical medicine and hygiene **29**(1): 82-85.
- Malaquias, L., P. Falcao, *et al.* (1997). "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 **46**(4): 393-398.

- Martins-Melo, F. R., M. Carneiro, *et al.* (2018). "The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016: a subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016." PLoS neglected tropical diseases **12**(6): e0006559.
- McManus, D. P., D. W. Dunne, *et al.* (2018). "Schistosomiasis (Primer)." Nature Reviews: Disease Primers.
- McManus, D. P., C. Gordon, *et al.* (2018). "Testing of water samples for environmental DNA as a surveillance tool to assess the risk of schistosome infection in a locality." International Journal of Infectious Diseases **76**: 128-129.
- McManus, D. P., D. J. Gray, *et al.* (2010). "Schistosomiasis in the People's Republic of China: the era of the Three Gorges Dam." Clinical microbiology reviews **23**(2): 442-466.
- Medzhitov, R., D. S. Schneider, *et al.* (2012). "Disease tolerance as a defense strategy." Science **335**(6071): 936-941.
- Minai, M., Y. Hosaka, *et al.* (2003). "Historical view of schistosomiasis japonica in Japan: implementation and evaluation of disease-control strategies in Yamanashi Prefecture." Parasitology international **52**(4): 321-326.
- Montenegro, S. M., P. Miranda, *et al.* (1999). "Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens." The Journal of infectious diseases **179**(6): 1502-1514.
- Murta, F. L. G., C. L. Massara, *et al.* (2016). "Ecotourism as a source of infection with *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais, Brazil." Tropical diseases, travel medicine and vaccines **2**(1): 3.
- Nascimento, G. L., H. M. Pegado, *et al.* (2019). "The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **114**.
- Negrão-Corrêa, D., J. F. Fittipaldi, *et al.* (2014). "Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil." PloS one **9**(2).
- Neves, R. H., C. de Lamare Biolchini, *et al.* (2005). "A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy." Parasitology research **95**(1): 43-49.
- Oliveira, W. J., F. do Carmo Magalhaes, *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 neglected tropical diseases **12**(2).
- Oliver-Gonzalez, J., P. M. Bauman, *et al.* (1954). "Intradermal response to egg antigen in humans with active and treated (fuadin) *Schistosoma mansoni* infections." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **87**(1): 186-188.
- ORGANIZATION, W. H. (1994). "Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. Geneva."
- ORGANIZATION, W. H. (2012). "Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020."
- ORGANIZATION, W. H. (2013). "Second WHO report on neglected tropical diseases: Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases."
- Pearce, E. J. and A. S. MacDonald (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." Nature Reviews Immunology **2**(7): 499-511.
- Pellegrino, J. (1958). "The intradermal test in the diagnosis of bilharziasis." Bulletin of the World Health Organization **18**(5-6): 945.

- Pellegrino, J. and A. Siqueira (1956). "A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs." Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais. Publicações avulsas **8**(4): 589-597.
- Pellón, A. and I. Teixeira (1953). "O inquérito Helmintológico escolar em cinco Estados das Regiões Leste-Sul e Centro-Oeste."
- Pellon, B. and I. Teixeira (1950). Distribuição geográfica da esquistosomose mansonica no brasil, Ministério da Educação e Saúde.
- Pinheiro, M. C. C., T. R. Carneiro, *et al.* (2012). "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." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **107**(7): 873-876.
- Pontes, L. A., E. Dias-Neto, *et al.* (2002). "Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces." The American journal of tropical medicine and hygiene **66**(2): 157-162.
- Rabello, A., L. Pontes, *et al.* (2008). "Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistosomose mansoni." OS Carvalho, PMZ Coelho, HL Lenzi, Schistosoma mansoni & esquistosomose, Fiocruz, Rio de Janeiro: 897-925.
- Rabello, A. L., M. M. A. Garcia, *et al.* (1995). "Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity." Clinical Infectious Diseases **21**(3): 608-615.
- Rabello, A. L. T., R. A. P. Da Silva, *et al.* (1994). "Abdominal ultrasonography in acute clinical schistosomiasis mansoni." The American journal of tropical medicine and hygiene **50**(6): 748-752.
- Ranasinghe, S. L., K. Fischer, *et al.* (2015). "Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*." Parasites & vectors **8**(1): 408.
- Ross, A. G., R. M. Olveda, *et al.* (2015). "Can mass drug administration lead to the sustainable control of schistosomiasis?" The Journal of infectious diseases **211**(2): 283-289.
- Ross, A. G., D. Vickers, *et al.* (2007). "Katayama syndrome." The Lancet infectious diseases **7**(3): 218-224.
- Sarvel, A. K., Á. A. Oliveira, *et al.* (2011). "Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil." PLoS neglected tropical diseases **5**(3).
- Saúde, B. M. d. (2008). "Guia de Vigilância Epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis."
- Savioli, L., M. Albonico, *et al.* (2017). "Building a global schistosomiasis alliance: an opportunity to join forces to fight inequality and rural poverty." Infectious diseases of poverty **6**(1): 65.
- Scholte, R. G., L. Gosoniu, *et al.* "Risk mapping and prediction of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models."
- Shane, H. L., J. R. Verani, *et al.* (2011). "Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya." PLoS neglected tropical diseases **5**(1).
- Silva-Moraes, V., L. M. Shollenberger, *et al.* (2019). "Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infections in endemic area in Brazil." PLoS neglected tropical diseases **13**(3): e0006974.

- Silva-Moraes, V., L. M. Shollenberger, *et al.* (2019). "Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas?" Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **114**.
- Silva, R. M. d., H. Y. Kanamura, *et al.* (1998). "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 **93**: 279-282.
- Silveira, A. M., J. Bethony, *et al.* (2002). "High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis." The American journal of tropical medicine and hygiene **66**(5): 542-549.
- Siqueira, L. M. V., P. M. Z. Coelho, *et al.* (2011). "Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **106**(7): 844-850.
- Siqueira, L. M. V., F. F. B. Couto, *et al.* (2016). "Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **49**(3): 341-347.
- Siqueira, L. M. V., L. I. Gomes, *et al.* (2015). "Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **110**(2): 209-214.
- Soentjens, P., L. Cnops, *et al.* (2014). "Late seroconversion of acute schistosomiasis." Journal of travel medicine **21**(3): 219-220.
- Soentjens, P., M. Ruyffelaert, *et al.* (2014). "Follow-Up of Treatment Response in Imported Acute Schistosomiasis." Journal of travel medicine **21**(6): 433-434.
- Sorgho, H., M. Bahgat, *et al.* (2005). "Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens." Acta tropica **93**(2): 169-180.
- Steinfeldt, S., J. F. Andersen, *et al.* (2009). "The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1)." Journal of Experimental Medicine **206**(8): 1681-1690.
- Stothard, J. R., N. B. Kabatereine, *et al.* (2006). "Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis." Acta tropica **97**(2): 219-228.
- Sulahian, A., Y. J. F. Garin, *et al.* (2005). "Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of schistosomiasis." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **12**(4): 548-551.
- Teixeira, C. F., E. Neuhauss, *et al.* (2007). "Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field." PLoS neglected tropical diseases **1**(2).
- Teles, H. M. S., C. S. Ferreira, *et al.* (2003). "The efficiency of the examination of compressed fecal samples for *Schistosoma mansoni* eggs." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **36**(4).
- Trizio, D., C. Della Bruna, *et al.* (1980). "Modification of immune responsiveness in murine Schistosomiasis mansoni. I. Time course after cercarial exposure." Immunology **40**(3): 353.
- Turner, P., K. Laloo, *et al.* (2004). "Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens." Journal of clinical pathology **57**(11): 1193-1196.
- Utzing, J., R. Bergquist, *et al.* (2003). "Sustainable schistosomiasis control—the way forward." The Lancet **362**(9399): 1932-1934.
- Valadares, T., P. Coelho, *et al.* (1981). "*Schistosoma mansoni*: aspects of the oviposition of the LE'strain in mice infected with a couple of worms." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **23**(1): 6-11.

- Van Lieshout, L., A. Polderman, *et al.* (2000). "Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections." Acta tropica **77**(1): 69-80.
- Van Roon, A.-M. M., K. K. Van de Vijver, *et al.* (2004). "Discrimination between the anti-monomeric and the anti-multimeric Lewis X response in murine schistosomiasis." Microbes and infection **6**(13): 1125-1132.
- Vendrame, C. M. V., M. D. T. Carvalho, *et al.* (2001). "Evaluation of anti-*Schistosoma mansoni* IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **43**(3): 153-159.
- Vereecken, K., C. W. Naus, *et al.* (2007). "Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*." Tropical Medicine & International Health **12**(3): 431-444.
- Viana, A. G., P. H. Gazzinelli-Guimarães, *et al.* (2019). "Discrepancy between batches and impact on the sensitivity of point-of-care circulating cathodic antigen tests for *Schistosoma mansoni* infection." Acta tropica **197**: 105049.
- Vitorino, R. R., F. Souza, *et al.* (2012). "Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle." Rev Soc Bras Clin Med **10**(1): 39-45.
- Walter, K., A. J. Fulford, *et al.* (2006). "Increased human IgE induced by killing *Schistosoma mansoni* in vivo is associated with pretreatment Th2 cytokine responsiveness to worm antigens." The Journal of Immunology **177**(8): 5490-5498.
- Wang, W., L. Wang, *et al.* (2012). "Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review." Parasitology research **111**(5): 1871-1877.
- Warren, K. S. (1982). "Schistosomiasis: host-pathogen biology." Clinical Infectious Diseases **4**(4): 771-775.
- Warren, K. S., R. W. Kellermeyer, *et al.* (1973). "Immunologic diagnosis of schistosomiasis: I. A controlled study of intradermal (immediate and delayed) and serologic tests in St. Lucians infected with *Schistosoma mansoni* and in uninfected St. Vincentians." The American journal of tropical medicine and hygiene **22**(2): 189-198.
- Weerakoon, K. G., G. N. Gobert, *et al.* (2015). "Advances in the diagnosis of human schistosomiasis." Clinical microbiology reviews **28**(4): 939-967.
- Weerakoon, K. G., C. A. Gordon, *et al.* (2018). "DNA diagnostics for schistosomiasis control." Tropical medicine and infectious disease **3**(3): 81.
- Whitfield, P., A. Bartlett, *et al.* (2003). "Age-dependent survival and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae." Parasitology **127**(1): 29-35.
- Wilkins, P. P. and J. S. Keystone (2013). "Schistosomiasis serology is valuable and reliable." Clinical Infectious Diseases **56**(2): 312-312.
- Wolmarans, C., K. De Kock, *et al.* (2002). "Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions." Journal of helminthology **76**(3): 273-277.
- Yu, J., S. De Vlas, *et al.* (2007). "Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and indirect hemagglutination assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China." Parasitology international **56**(1): 45-49.
- Zhang, Z., A. B. Clark, *et al.* (2009). "Nonparametric spatial analysis to detect high-risk regions for schistosomiasis in Guichi, China." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **103**(10): 1045-1052.
- Zhou, X.-N., J.-G. Guo, *et al.* (2007). "Epidemiology of schistosomiasis in the People's Republic of China, 2004." Emerging infectious diseases **13**(10): 1470.

- Zhou, Y.-B., M.-X. Yang, *et al.* (2007). "Field comparison of immunodiagnostic and parasitological techniques for the detection of schistosomiasis japonica in the People's Republic of China." The American journal of tropical medicine and hygiene **76**(6): 1138-1143.
- Zhu, Y.-C. (2005). "Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review." Acta tropica **96**(2-3): 130-136.
- Zoni, A. C., L. Catala, *et al.* (2016). "Schistosomiasis prevalence and intensity of infection in Latin America and the Caribbean countries, 1942-2014: a systematic review in the context of a regional elimination goal." PLoS neglected tropical diseases **10**(3).

## 10. ANEXO

### 10.1. 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-cpqr@cpqr.fiocruz.br](mailto:cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br).

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participantes menores de 18 anos

Convite para participar

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é \_\_\_\_\_ 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 ecoepidemiológicos distintos.”

Leiam e/ou ouçam atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento ou assentimento.

### Informações sobre o Estudo

O projeto em andamento será realizado nos Municípios 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 N° 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 xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes). Ao concordar com a participação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade 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 do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade 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 o seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade que porventura participe da pesquisa são mínimos. 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 a identificação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade serão guardados 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 e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade também podem e devem 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 e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade poderão se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal para ambos. Você e seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade têm 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 saúde ou bem estar físico do seu filho ou menor sob sua responsabilidade. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

#### Consentimento e Assentimento

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)