

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE E COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE E
ESPECIFICIDADE ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO PARA *Schistosoma mansoni*: GRADIENTE SALINO,
HELMINTEX®, CENTRÍFUGO-SEDIMENTAÇÃO, KATO-KATZ E
TESTE RÁPIDO URINA (POC-CCA).**

Warllem Junio de Oliveira

BELO HORIZONTE

2015

Warllem Junio de Oliveira

**ANÁLISE E COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE E
ESPECIFICIDADE ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO PARA *Schistosoma mansoni*: GRADIENTE SALINO,
HELMINTEX®, CENTRÍFUGO-SEDIMENTAÇÃO, KATO-KATZ E
TESTE RÁPIDO URINA (POC-CCA).**

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia do
Departamento de Parasitologia -
Instituto de Ciências Biológicas -
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção
do título de mestre em Parasitologia.**

Orientador: Dr. Stefan Michael Geiger

BELO HORIZONTE

2015

“Depois de uma longa espera consegui, finalmente, plantar o meu jardim.
Tive de esperar muito tempo porque jardins precisam de terra para existir.
Mas a terra eu não tinha. De meu, eu só tinha o sonho.
Sei que é nos sonhos que os jardins existem,
antes de existirem do lado de fora.
Um jardim é um sonho
que virou realidade”.

Rubem Alves

Dedico este trabalho aos meus pais
Gerson e Creuza, aos meus irmãos
William e Wallace e à minha irmã Simone,
pela educação e carinho que me deram!
À minha namorada Maira,
pelo amor e apoio constante!

Agradecimentos

À Deus, por ter orientado os meus passos nessa longa e múltipla jornada.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação que, desde a graduação, sempre me ofereceram o suporte necessário.

À Prefeitura, à Secretaria Municipal de Saúde e à Equipe de Endemias de Januária pelo suporte técnico-operacional, o qual muito facilitou as nossas atividades.

À população do Distrito de Brejo do Amparo, Município de Januária, Minas Gerais que mesmo ainda estando bem cedinho nos atendia de modo muito receptivo e acolhedor. O conhecimento adquirido não foi apenas acadêmico, foi também humanístico e transformador. Foi um imenso prazer ter conhecido cada morador, cada história!

Ao meu pai pelos seus ensinamentos. Ao longo desses 24 meses jamais me esqueci do conselho “Quem quer ter dois, pode no final não ter nenhum”. Deu certo!

À minha mãe pelas noites mal dormidas, devido às minhas constantes ausências.

Aos meus irmãos e irmã por ouvirem os meus lamentos nos momentos difíceis.

À todos os parentes, em especial aos tios Nico e Henrique que nos momentos de pressão me ajudaram a mergulhar as mágoas em águas douradas e cristalinas!

À namorada Maira pelo amor, apoio, compreensão e pela preciosa ajuda nas atividades de campo e também na formatação e revisão da dissertação. À sua família por me fazer sentir estar em casa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Stefan Michael Geiger por ter me oferecido esse prazeroso “Projeto Januária”, por sempre ter estado presente e pelos inúmeros ensinamentos, mas acima de tudo, muito obrigado pela confiança, da qual jamais me esquecerei.

Ao Laboratório de Esquistossomose – Fiocruz/René Rachou - MG, em especial ao Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho e ao Áureo A. Almeida que tiveram um imenso protagonismo na realização do método Gradiente Salino.

Ao Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia - UFMG, em especial à Prof^a. Dra. Deborah A. Negrão-Corrêa por permitir a realização de diversos experimentos em seu laboratório e também pelos ensinamentos.

Ao Laboratório de Genômica de Parasitos- UFMG, em especial ao Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e ao Dr. Pedro H. Gazzinelli Guimarães que nos auxiliaram no treinamento e interpretação dos Testes rápidos de urina.

Ao Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias - UFMG, em especial à Prof^a. Dra. Mariângela Carneiro que muito nos auxiliou com as análises estatísticas.

Ao Laboratório de Amebíase - UFMG, em especial à Prof^a. Dra. Maria Aparecida Gomes e ao Doutorando Frederico Gil que nos auxiliaram com a realização do MIFC.

Ao Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira, à Vivian Favero e equipe (PUC-RS) que contribuíram com a realização do método Helmintex®.

Ao Prof. Dr. Alan Lane de Melo, por ter sido um importante intermediador nas relações desse projeto com a população e os órgãos públicos do município de Januária e também por não ter medido esforços na transmissão de conhecimentos ou empréstimos de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Pezzi Guimarães e à Dra. Glória Suzana Meléndez Bastos de Souza que ao me inserirem em sua pesquisa fizeram com que eu me apaixonasse ainda mais pelo fascinante mundo da Parasitologia.

Ao pessoal do Laboratório de Helmintologia Intestinal (Andresa, Andrea, Ariádna, Débora, Marco Túlio, Maurício, Paulo, “Papai” e Wanessa) pelos bons momentos de trabalho, mas também de descontração.

À(o) Emília, Fernanda, “Iza”, JáiIza, João, Michele, Vanessa e Vinícius que de alguma forma sempre contribuíram com as minhas atividades.

À Secretaria da Pós-Graduação, em especial à Sumara e SibeIe, pela dedicação, sinceridade e boa fé em contribuir com o crescimento dos alunos.

Aos técnicos de laboratório Beth, Edna, Hudson, Joãozinho, Márcia, Rosa e Zé, sem os quais a realização de qualquer pesquisa se tornaria muito mais complicada.

Apoio Financeiro

Agradeço ao CNPq pela concessão da minha bolsa de estudos ao longo do curso, à UFMG e ao Departamento de Parasitologia pelo suporte técnico, infraestrutura e materiais disponibilizados. Ao Programa DECIT (Ministério de Saúde/ CNPq, Nº 40/2012) – Pesquisa em Doenças Negligenciadas, o qual financiou parcialmente esse Projeto de Pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XVIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	20XX
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Epidemiologia da doença.....	22
1.1.1 Esquistossomose no mundo	22
1.1.2 Esquistossomose na América Latina.....	23
1.1.3 Esquistossomose no Brasil	23
1.2 Controle	25
1.3 Ciclo biológico.....	26
1.4 Diagnóstico	27
1.4.1 Métodos parasitológicos.....	27
1.4.2 Métodos imunológicos	30
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4.1 Área de estudo	33
4.2 Facilitadores do estudo	34
4.3 População de estudo.....	34
4.4 - Coleta, conservação e processamento das amostras	35
4.4.1 Fezes.....	35
4.4.2 Urina.....	37
4.5 Identificação dos indivíduos positivos para esquistossomose mansônica	37
4.5.1 Método Kato-Katz	37
4.5.2 Método Centrífugo-Sedimentação - MIFC	40
4.5.3 Método Gradiente Salino	41
4.5.4 Método Helmintex®	44
4.5.6 Teste Rápido Urina (POC-CCA).....	45

4.6 Análise Estatística.....	46
4.6.1 “Padrão Ouro”, Prevalência e Taxa de positividade	47
4.6.2 Parâmetros estatísticos utilizados na validação dos métodos	47
4.6.3 Concordância diagnóstica	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Perfil populacional e prevalência.....	50
5.2 Avaliação do método Centrífugo-sedimentação (MIFC)	52
5.3 Método Gradiente salino.....	53
5.4 Método Helmintex®	54
5.5 Método Teste rápido de urina (POC-CCA)	55
5.6 Diagnóstico da esquistossomose a partir do método Kato-Katz.....	56
5.6.1 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e duas lâminas	56
5.6.2 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e seis lâminas	57
5.6.3 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e doze lâminas.....	58
5.6.4 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e quatorze lâminas.....	59
5.6.5 Avaliação do método Kato-Katz com três amostras e seis lâminas	59
5.7 Efeito do aumento do número de lâminas do método Kato-Katz para uma mesma amostra.....	60
5.8 Determinação do número de ovos por grama de fezes	61
5.9 – Avaliação do desempenho de cada método em função da carga parasitária encontrada pelo AM1 K1-K2	63
5.10 – Síntese e comparação dos valores observados com os diferentes métodos	64
5.11 Combinações entre dois métodos	65
5.11.1 Combinação entre o método parasitológico Helmintex® em relação aos demais métodos utilizados no diagnóstico da esquistossomose mansoni	66
5.11.2 Comparação entre o método Kato-Katz com duas lâminas de uma mesma amostra (AM1 K1-K2) em relação às demais metodologias de diagnóstico para a esquistossomose mansoni	73
5.12 Avaliação da prevalência e taxa de positividade apresentada por cada combinação ...	78
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
8. ANEXOS	92
9 REFERÊNCIAS	95

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição global da esquistossomose, 2011.	22
Figura 2: Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni no Brasil, 2012.	24
Figura 3: Ciclo biológico do parasito <i>S. mansoni</i>	27
Figura 4: Córrego Tocantins situado no distrito de Brejo do Amparo, Município de Januária – MG, onde os moradores lavam roupas e utensílios de cozinha (a) ou tomam banho (b).....	34
Figura 5: Métodos parasitológicos de fezes utilizados em cada amostra.....	36
Figura 6: Transferência do conteúdo fecal, peneirado, para a lâmina de vidro através do orifício da placa de plástico.....	38
Figura 7: Lâmina de Kato-Katz, na qual são observados ovos de <i>S. mansoni</i> (setas), através de microscopia óptica.....	39
Figura 8: Desenho esquemático da região lateral do equipamento utilizado no processamento das amostras, por meio do método gradiente salino. a) base; b) suporte do reservatório maior; c) suporte do reservatório menor; d) reservatório maior; e) regulador do fluxo	42
Figura 9: Equipamento utilizado na realização do método gradiente salino aprimorado. Desenho esquemático da vista lateral, no qual somente dois dos 12 reservatórios de separação estão representados.	43
Figura 10: Interpretações dos testes rápidos de urina, de acordo com cada padrão de bandeamento. Os números superiores (cor preta) referem-se à identificação do paciente e os inferiores (cor azul) ao diagnóstico. Negativo (Neg): linha C (inferior) rosada e linha T (superior) ausente. Positivo - Traço: linha C rosada e linha T muito fracamente rosada. Positivo simples (+1): linha C rosada e linha T fracamente rosada. Positivo duplo (+2): linha C e linha T rosadas. Positivo triplo (+3): linha C rosada e linha T fortemente rosada.	46
Figura 11: Perfil da população em estudo de acordo com a porcentagem de indivíduos do gênero masculino e feminino.....	50
Figura 12: Proporção de indivíduos participantes em relação às diferentes faixas etárias.	51
Figura 13: Prevalência da esquistossomose observada em cada faixa etária.....	52
Figura 14: Distribuição e classificação quanto à carga parasitária dos indivíduos diagnosticados como positivos para <i>S. mansoni</i> , pelo método gradiente salino, de acordo com	

o número de ovos eliminados por grama de fezes em infecção leve (OPG 1-99), moderada (100-399) ou alta (OPG >399) de acordo com a OMS (2002).	54
Figura 15: Efeito do aumento do número de lâminas e amostras analisadas pelo método Kato-Katz, em relação à sensibilidade e a prevalência da esquistossomose.	60
Figura 16: Distribuição e classificação dos indivíduos positivos com base no número de ovos eliminados por grama de fezes (OPG), segundo o método Kato-Katz com duas lâminas de uma única amostra. Classificação em carga parasitária leve (OPG 1-99; n=32), moderada (OPG 100-399; n=12), e alta (OPG > 399; n=4) de acordo com a OMS (2002).	61
Figura 17: Distribuição do número de indivíduos com baixa carga parasitária.	62
Figura 18: Distribuição e classificação dos indivíduos positivos com base no número de ovos eliminados por grama de fezes (OPG), segundo o método Kato-Katz com doze lâminas de uma única amostra. Classificação em carga parasitária leve (OPG 1-99; n=32), moderada (OPG 100-399; n=12), e alta (OPG > 399; n=4) de acordo com a OMS (2002).	63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação da intensidade das infecções por <i>S. mansoni</i> com base no número de ovos eliminados por grama de fezes.....	28
Tabela 2: Tabela 2x2 e os principais dados estatísticos (Sensibilidade; Especificidade; VP – Verdadeiro Positivo; VN – Verdadeiro Negativo; FP – Falso Positivo; FN – Falso Negativo; VPP – Valor Preditivo Positivo; VPN – Valor Preditivo Negativo) utilizados na análise dos resultados.....	48
Tabela 3: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método centrífugo-sedimentação, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.....	52
Tabela 4: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método gradiente salino, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.....	53
Tabela 5: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Helmintex®, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.....	55
Tabela 6: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.....	55
Tabela 7: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método teste rápido de urina, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.....	56
Tabela 8: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com duas lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.....	57

Tabela 9: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com seis lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	58
Tabela 10: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com doze lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	58
Tabela 11: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com quatorze lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	59
Tabela 12: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com duas lâminas, provenientes de três amostras cada, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	60
Tabela 13: Avaliação do desempenho de diferentes métodos de diagnóstico em função da carga parasitária encontrada a partir da leitura de duas lâminas de Kato-Katz (AM1 K1-K2). Observação: AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz e; POC-CCA: Teste rápido de urina.	64
Tabela 14: Síntese e comparação dos valores estatísticos obtidos a partir da análise dos resultados encontrados com os diferentes métodos diagnósticos, tendo como referência o número de indivíduos positivos confirmados pelo “Padrão Ouro”	65
Tabela 15: Procedimento adotado diante de cada situação, ao longo do processo de contabilização do diagnóstico de cada indivíduo.	66
Tabela 16: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e gradiente salino, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores	

indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	67
Tabela 17: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e centrífugo-sedimentação, para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	68
Tabela 18: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	69
Tabela 19: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com seis lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K6), para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	70
Tabela 20: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com doze lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K12), para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	71
Tabela 21: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com quatorze lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K14), para a infecção por <i>S. mansoni</i>	71
Tabela 22: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com duas lâminas de três amostras cada (AM 1-3 K1-K2), para a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> . Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”	72
Tabela 23: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por <i>Schistosoma</i>	

mansoni. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro” 73

Tabela 24: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), e Centrífugo-sedimentação, para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”. 74

Tabela 25: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), e gradiente salino, para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”. 75

Tabela 26: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”. 76

Tabela 27: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com seis lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K6), e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”. 77

Tabela 28: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas provenientes de três amostras cada (AM 1 K1-K6), e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”. 78

Tabela 29: Prevalência e Taxa de positividade da esquistossomose detectada a partir da combinação entre o método Helmintex® e as demais técnicas, em relação aos indivíduos positivos diagnosticados pelo Padrão Ouro (soma dos diagnósticos parasitológicos). 79

Tabela 30: Prevalência e Taxa de positividade da esquistossomose detectada a partir da combinação entre o método Kato-Katz e as demais técnicas, em relação aos indivíduos positivos diagnosticados pelo Padrão Ouro (soma dos diagnósticos parasitológicos). 79

Lista de Abreviaturas

ACS: Agente Comunitário de Saúde.

AM1 K1-K2: Amostra 01 com duas lâminas de Kato-Katz.

AM1 K1-K6: Amostra 01 com seis lâminas de Kato-Katz.

AM1 K1-K12: Amostra 01 com doze lâminas de Kato-Katz.

AM1 K1-K14: Amostra 01 com quatorze lâminas de Kato-Katz.

AM1-3 K1-K2: Amostra 01, 02 e 03 com duas lâminas de Kato-Katz.

CAA: Antígenos Anódicos Circulantes.

CCA: Antígenos Catódicos Circulantes.

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

FN: Falso Negativo.

FP: Falso Positivo.

IC: Intervalo de Confiança.

ICB: Instituto de Ciências Biológicas.

KK: Kato-Katz.

MIFC: Sinônimo de Centrífugo-sedimentação.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OPG: Ovos Por Grama de fezes.

PCE: Programa de Controle da Esquistossomose.

POC-CCA: “Point of Care”; Sinônimo de Teste rápido de urina.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

VN: Verdadeiro Negativo.

VP: Verdadeiro Positivo.

VPN: Valor Preditivo Negativo.

VPP: Valor Preditivo Positivo.

RESUMO

A esquistossomose mansoni, ocasionada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, é uma doença tropical negligenciada que afeta milhões de indivíduos na África e América Latina. Para o diagnóstico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o método Kato-Katz (K-K), com duas lâminas de uma única amostra fecal, como método coprológico padrão. Entretanto, em áreas de baixa endemicidade ou em indivíduos com baixa carga parasitária, o método K-K tem apresentado uma baixa sensibilidade. Como resultado, um elevado número de indivíduos é diagnosticado como falso negativo, dificultando, portanto, o controle ou erradicação da doença. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar a sensibilidade e especificidade dos métodos K-K, Centrífugo-Sedimentação (MIFC), Gradiente Salino (GRAD), Helmintex® (HTX) e Teste rápido de urina (POC-CCA) em relação ao Padrão Ouro (PO), o qual inclui todos os indivíduos positivos detectados por algum tipo de método parasitológico direto. Três amostras fecais de 257 indivíduos, moradores do distrito Brejo do Amparo, Município de Januária, Minas Gerais, Brasil, foram coletadas durante três dias consecutivos e analisadas pelos diferentes métodos diagnósticos. Para o K-K, 14 lâminas foram preparadas a partir da primeira amostra fecal e duas lâminas para a segunda e terceira amostra. O Gradiente Salino utilizou 500 mg de fezes da primeira amostra. No caso do HTX, foi utilizado um total 30 g de fezes da primeira amostra que, após os processos de filtração e lavagem, foram submetidas à combinação com esferas paramagnéticas. Durante a preparação do MIFC, 2 g de fezes de cada amostra foram homogeneizadas com solução conservante e éter etílico e, em seguida, centrifugadas. Já para o POC-CCA, os pacientes forneceram uma pequena amostra urinária. A análise estatística determinou o desempenho de cada método, em termos de prevalência e sensibilidade, e em combinação com algum outro teste e também em relação à carga parasitária. A prevalência aumentou de 20,4% (Padrão OMS) para 45,9% (PO). O MIFC foi o método menos sensível para o diagnóstico da esquistossomose, mesmo em indivíduos com alta carga parasitária. A sensibilidade do GRAD foi igual à observada com duas lâminas de Kato-Katz. Além disso, o método HTX foi o que apresentou o melhor desempenho, devido ao grande volume fecal analisado e aos sucessivos processos de purificação da amostra. O aumento do número de lâminas e de amostras acarretou em um melhor desempenho do método K-K. Contudo, uma leitura superior a seis lâminas não resultou em um melhor desempenho do método. O POC-CCA apresentou um desempenho igual ao do K-K com três amostras e duas lâminas cada (AM 1-3 K1-K2), inclusive na detecção de indivíduos com baixa carga parasitária. Para a combinação de diferentes métodos diagnósticos, o melhor desempenho foi alcançado com o HTX e AM 1-3 K1-K2 ou entre HTX e POC-CCA, as quais apresentaram desempenho semelhante. Para o K-K, as melhores combinações foram obtidas ao se utilizar seis lâminas provenientes de uma ou de três amostras com o POC-CCA. Conclui-se que a sensibilidade do K-K se eleva com o aumento do número de lâminas e/ou amostras e que a combinação entre diferentes métodos também contribui para um diagnóstico mais preciso da esquistossomose, em áreas de baixa carga parasitária. No entanto, o presente estudo recomenda o emprego da combinação entre o método Kato-Katz com seis lâminas de uma mesma amostra e POC-CCA, devido à sua maior aplicabilidade, uma vez que apresenta baixo custo, fácil execução e pequenos volumes amostrais.

ABSTRACT

Human intestinal schistosomiasis, caused by the trematode *Schistosoma mansoni*, is a neglected tropical disease that affects millions of people in Africa and Latin America. For diagnosis, the World Health Organization (WHO) recommends the Kato-Katz method (KK) with two slides prepared from a single fecal sample as standard coprological method. However, in areas of low endemicity or in subjects with low parasite load, the KK method has shown low sensitivity. As a result, a large number of individuals are diagnosed as false negative, difficulting the control or eradication of the disease. Thus, the objective of this study was to compare the sensitivity and specificity of KK method, Centrifugal-Sedimentation (MIFC), Saline gradient (GRAD), Helmintex (HTX) and Rapid Urine test (POC-CCA) in relation to the Gold Standard, which includes all positive individuals detected by some kind of direct parasitological method. Three fecal samples from 257 individuals, residents of Brejo do Amparo, county of Januária, Minas Gerais, Brazil, were collected during three consecutive days and analyzed by different diagnostic methods. For KK, 14 slides were prepared from the first and two slides from the second and third sample fecal sample. For the saline gradient, 500 mg of feces were used from the first sample. In the case of HTX, we used a total of 30 g of feces from the first sample, which was submitted to filtration and washing procedures, before mixing it with paramagnetic beads. During the preparation of MIFC, 2 g of feces of each sample was homogenized and pooled in preservative solution. The pooled samples were mixed with ethyl ether and then centrifuged. As for the POC-CCA, patients provided a urine sample. The statistical analysis determined the performance of each method in terms of prevalence and sensitivity, and in combination with any other test and also in relation to the parasite burden. The prevalence increased from 20.4% (WHO standard) to 45.9% in the gold standard. The MIFC was the least sensitive method for the diagnosis of schistosomiasis, even in individuals with a high parasite load. The sensitivity of GRAD was equal to that observed with two Kato-Katz slides. In addition, the HTX method showed the best performance, most probably because of the analyzed fecal volume and the successive sample purification processes. An increased number of slides and samples resulted in a better performance of the KK method. However, further reading of more than six slides did not result in a better performance of the method. The POC-CCA presented a performance equal to that of KK with three samples and two slides each, including the detection of individuals with low worm burden. For the combination of different diagnostic methods, the best performance was achieved with the HTX and KK with two slides each from three samples or between HTX and POC-CCA, which showed similar performance. For KK the best combinations were obtained when using six slides from one or three fecal samples with POC-CCA. We conclude that the sensitivity of KK rises with increasing number of slides and / or samples and that a combination of different methods also contributes to a more accurate diagnosis of schistosomiasis in areas of low parasite load. However, this study recommends the use of a combination of the KK method with six slides of the same sample and POC-CCA due to their wider applicability, since it is inexpensive, easy to perform and requires reduced sampling efforts.

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são doenças que além de prevalecerem em condições de pobreza, também favorecem a manutenção da desigualdade social, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (DECIT, 2010).

Dentre elas, destaca-se a esquistossomose que é uma doença ocasionada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*. As principais espécies são *S. haematobium* (Bilharz, 1852), *S. japonicum* (Katsurada, 1904) e *S. mansoni* (Sambon, 1907).

O helminto *S. haematobium* é o agente etiológico da esquistossomose vesical, também conhecida como hematúria do Egito, uma vez que a presença do verme pode ocasionar a eliminação de urina sanguinolenta. A doença se distribuiu no território africano, principalmente no Egito, e Oriente Médio. Os vermes adultos habitam os ramos pélvicos do sistema porta, o que explica a eliminação dos ovos na urina. A espécie possui moluscos do gênero *Bulinus* como hospedeiros intermediários (Chitsulo *et al.*, 2000; Gryseels *et al.*, 2006).

O trematódeo *S. japonicum* provoca a esquistossomose japônica (moléstia de Katayama) e pode ser encontrado em uma ampla área do continente asiático, como na China e Ilhas Filipinas. Os vermes adultos vivem no sistema porta e os ovos podem ser encontrados em amostras fecais. Os moluscos do gênero *Oncomelania* são os hospedeiros intermediários. (Gryseels *et al.*, 2006)

A espécie *Schistosoma mansoni* ocasiona a esquistossomose mansoni, sendo encontrada nas Américas, Caribe e África. A doença é a única observada no Brasil, onde também é conhecida como “Xistose” ou “Barriga d’água”. Os vermes adultos parasitam o sistema porta, onde, após o acasalamento, as fêmeas realizam a postura dos ovos, os quais serão eliminados nas fezes. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são tidos como os hospedeiros intermediários. Os indivíduos infectados por *S. mansoni* podem apresentar manifestações clínicas tais como, formação de granulomas hepáticos ou entéricos (Farid, 1993), anemia, fibrose do sistema portal, hepatomegalia, e ascite (Lambertucci, 1993).

1.1 Epidemiologia da doença

1.1.1 Esquistossomose no mundo

As infecções ocasionadas pelos trematódeos do gênero *Schistosoma* já foram notificadas em 78 países, sendo que em 19 deles não se tem ocorrido notificações de casos recentes, o que pode indicar a interrupção da doença (WHO, 2012). Ainda assim, a doença é considerada como o principal problema de saúde pública afetando mais de 200 milhões de pessoas, ao passo que cerca de 700-800 milhões de pessoas residem em áreas endêmicas situadas principalmente nos países em desenvolvimento localizados na África, Ásia e América Latina (WHO, 2009; Gryseels *et al.*, 2006; Steinmann *et al.*, 2006) (Figura 01). Contabilizam-se, ainda, cerca de 280 mil óbitos anuais, devido ao parasitismo e suas complicações (Van der Werf *et al.*, 2003).

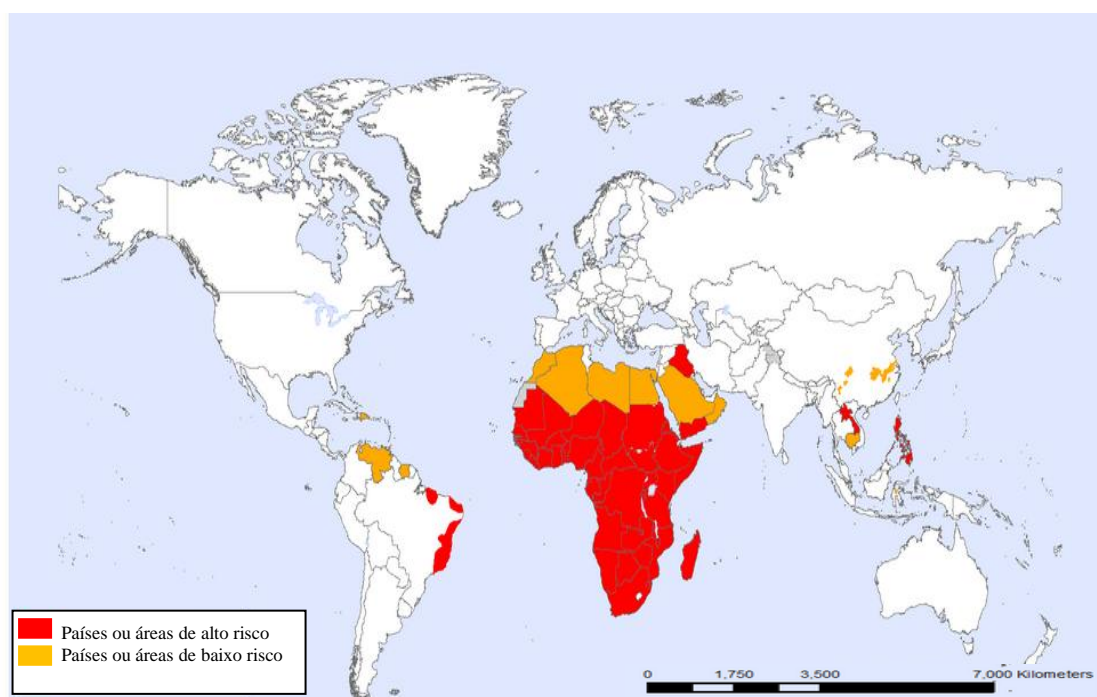


Figura 1: Distribuição global da esquistossomose, 2011. Fonte: WHO, 2012 - Adaptado.

1.1.2 Esquistossomose na América Latina

Na América Latina, os países Brasil, Santa Lúcia, Suriname e Venezuela são considerados endêmicos para a esquistossomose mansoni. Em Santa Lúcia e Suriname os baixos níveis de transmissão registrados apontam para uma grande possibilidade de interrupção da transmissão em um futuro próximo. Entretanto, Brasil e Venezuela apresentam áreas com elevada taxa de transmissão (PAHO, 2014), visto que a doença se estabelece em regiões, onde o saneamento básico é ausente ou inadequado permitindo que as formas infectantes do parasito encontrem coleções hídricas e infectem o homem pelas mucosas ou pele íntegra (Barbosa *et al.*, 1996).

1.1.3 Esquistossomose no Brasil

Estima-se que, no Brasil, cerca de 25 milhões de pessoas residam em regiões sob o risco de serem infectadas com o parasito (Brasil, 2014). Há registros de transmissão da doença em todas as suas regiões, atingindo 18 estados da federação e o Distrito Federal. As principais áreas endêmicas se situam nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Pernambuco, enquanto que áreas focais são registradas no Ceará, Distrito Federal, Maranhão, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (Brasil, 2014) (Figura 02). Dentre essas áreas focais, a última a ser descoberta foi em 1997, no município de Esteio, no Rio Grande do Sul (Graeff-Teixeira, 1999).

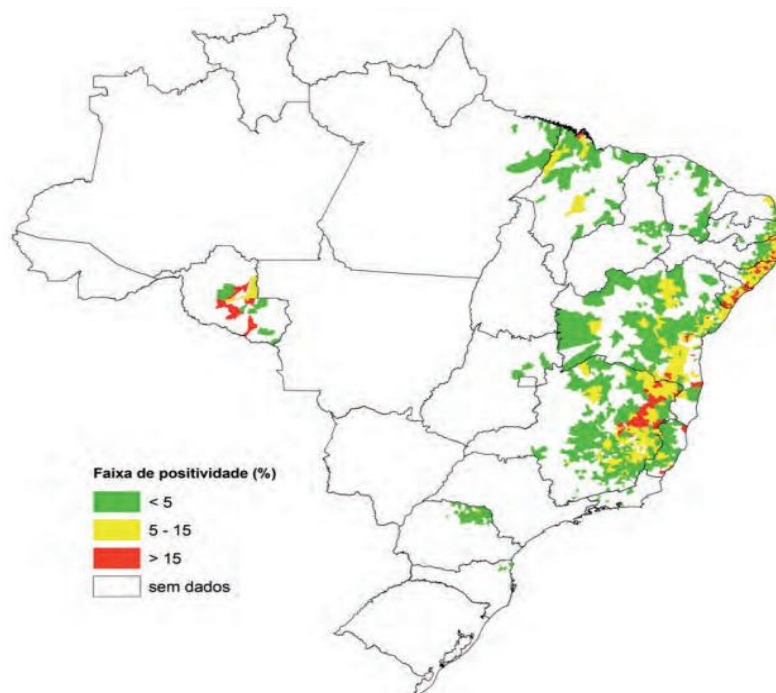


Figura 2: Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni no Brasil, 2012.

A doença ainda segue em expansão no território brasileiro, principalmente, devido à intensa atividade migratória em direção às áreas com condições de saneamento inadequadas. A transmissão da doença, por sua vez, é favorecida pela: grande quantidade de ovos eliminados pelas fêmeas diariamente (média de 300 ovos/dia); vermes adultos com longevidade e continua manutenção da capacidade reprodutiva ao longo de décadas; cronicidade da doença, fazendo com que o indivíduo não procure centros médicos para diagnóstico e tratamento; facilidade de contrair a doença e; persistência de precárias condições de saneamento tanto na zona rural como na periferia dos grandes centros urbanos, possibilitando a contaminação das coleções d'água (Brasil, 2014).

Ao longo dos anos 2000, diversos surtos de casos agudos da esquistossomose foram relatados na região metropolitana de Aracajú/SE (Jesus *et al.*, 2002) e de Recife/PE (Barbosa *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2001), onde estavam relacionados com a criação de áreas de veraneio em regiões com saneamento básico precário. Na região metropolitana de Belo Horizonte/MG o turismo rural (Enk *et al.*, 2004; Enk *et al.*, 2010) e o ecoturismo (Massara *et al.*, 2008) em áreas carentes em rede de esgoto foram apontados como fatores de risco para tais casos. No interior de São Paulo as práticas esportivas aquáticas (pescaria, canoagem,

escalada de cachoeiras, entre outras) foram associadas com a ocorrência dos casos registrados (Tomé *et al.*, 2003).

1.2 Controle

Nos últimos anos, o poder público brasileiro adotou diversas medidas para combater os altos índices de endemidade para esquistossomose, até então registrados no país. Dentre essas medidas governamentais, ressalta-se a criação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), na década de 1980. O programa, seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), estabeleceu o método Kato-Katz, como padrão-ouro, para o diagnóstico da doença, devido à elevada especificidade, ao baixo custo e facilidade operacional (WHO, 1994). Além disso, no intuito de controlar o avanço da doença, a adoção do tratamento em massa, a correta destinação das excretas, a melhoria do acesso à água potável e também a ampliação da educação têm contribuído amplamente para a redução da prevalência e incidência da esquistossomose. (WHO, 2005; WHO, 2009).

Em uma análise do impacto do programa de controle da esquistossomose, no Brasil, realizada por Amaral *et al.* (2006), foi observado que ao longo dos últimos anos, o PCE realizou milhões de exames coproscópicos, bem como o tratamento quimioterápico dos indivíduos diagnosticados como positivos. Esses dados foram recentemente confirmados por uma publicação do ministério da saúde, a qual também apontou uma diminuição do percentual de positividade nas populações examinadas, chegando ao seu menor percentual (4,5%) em 2012 (Brasil, 2014).

Outra importante medida de controle da esquistossomose foi o aumento do número de indivíduos com acesso a água potável e adequada estrutura de saneamento em suas moradias. Sendo que para o ano de 2015, está previsto um índice superior a 97% para o primeiro fator e cerca de 80% para o segundo fator (WHO, 2014). Acrescenta-se ainda, o combate ao molusco por meio do uso de moluscidas nas coleções d'água.

O controle dos hospedeiros intermediários não é uma prática utilizada rotineiramente e o seu emprego apenas é recomendado em casos especiais e em caráter complementar. Um exemplo de situação em que sua adoção é recomendada se baseia em localidades com altas prevalências que persistem mesmo com o tratamento periódico da população ou quando há surtos localizados de casos agudos (Brasil, 2008).

Entretanto, o controle efetivo da esquistossomose no Brasil é uma tarefa de difícil execução, devido as seguintes razões: (a) alto custo e baixa eficácia dos moluscidas, além

dos mecanismos de escape dos hospedeiros intermediários ao produto; (b) elevados custos para implantação das condições sanitárias e de abastecimento de água nas áreas rurais; (c) o tratamento maciço é eficaz para controlar a morbidade, mas não para reduzir a prevalência, devido às constantes reinfecções; (d) a ausência de uma vacina eficaz para a prevenção da esquistossomose (Coura, JR & Amaral, RS, 2004). Além disso, em áreas de baixa endemicidade, a maioria dos indivíduos infectados por *S. mansoni* são assintomáticos ou manifestam baixa morbidade, além de apresentarem uma taxa de eliminação de ovos inferior a 100 ovos por grama de fezes, resultando em um elevado número de indivíduos falso-negativos (Noya *et al.*, 2006).

Por tais razões, o desenvolvimento de novos métodos ou o aperfeiçoamento das atuais técnicas de diagnóstico para a esquistossomose deve ser estimulado, visto que o mapeamento, a estimativa do ônus da doença, a avaliação da eficácia dos quimioterápicos, o monitoramento dos programas de controle e verificação dos locais de eliminação dependem de diagnósticos precisos (Utzinger *et al.*, 2011).

1.3 Ciclo biológico

Após atingirem a maturidade no sistema cardiovascular humano ou de outro mamífero, o casal de vermes de *Schistosoma mansoni*, alcançam as veias mesentéricas inferiores, onde se acasalam e as fêmeas liberam os seus ovos (Melo & Coelho, 2011). Estes se tornam embrionados e chegam à luz intestinal, onde se misturam ao material fecal e são eliminados. Ao atingirem uma coleção d'água (lago, lagoa, rio) a larva miracídio emerge do ovo e, por meio de batimentos ciliares e estímulos químicos, nadam até localizar um caramujo do gênero *Biomphalaria*. Após interação quimiotática, a larva penetra no molusco e evolui para a fase de esporocisto (esporocisto I, II e III), que é um conjunto de células reprodutivas capaz de originar centenas de larvas cercárias. Quando sob estímulo de altas temperaturas e intensa luminosidade (Lutz, 1919), as cercárias são liberadas na água, onde sobrevivem por um período aproximado de 36 horas (Leiper, 1915). Essas larvas ao entrarem em contato com a pele ou mucosa do homem (hospedeiro definitivo) realizam a penetração. Durante a penetração a larva cercária perde a cauda (Leiper, 1915), sendo agora denominadas de esquistossômulos. Estes migram sob o tecido subcutâneo até alcançarem algum vaso sanguíneo, pelo qual se deslocam passivamente até alcançar os pulmões, via coração direito. A partir de então, os esquistossômulos migram para o sistema porta, onde se alimentam e

diferenciam em machos e fêmeas (Figura 03). Quando atinge a maturidade os vermes adultos alcançam as veias mesentéricas inferiores, onde ocorre a oviposição.

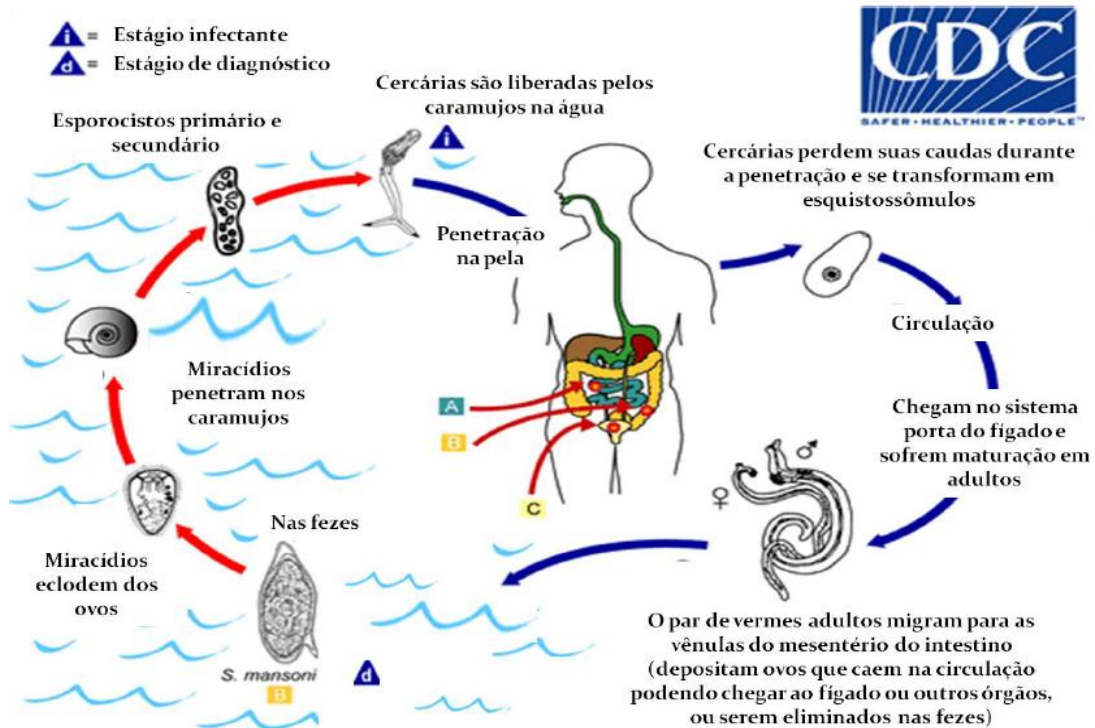


Figura 3: Ciclo biológico do parasito *S. mansoni*. Fonte: adaptado de CDC: [HTTP://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm).

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos de fezes se baseiam na verificação macroscópica da consistência e do odor fecal, bem como da presença de conteúdo sanguíneo e/ou fragmentos dos parasitos. Em relação à análise microscópica, é possível a visualização da presença de ovos ou larvas dos parasitos eliminados junto às fezes. Os exames parasitológicos de fezes são divididos em dois grupos, qualitativo e quantitativo. Os métodos qualitativos são os mais utilizados e se caracterizam pela capacidade de identificação dos tipos de parasitos que o

indivíduo possui sem, no entanto, realizar a sua quantificação. Dentre eles estão os métodos de Sedimentação Espontânea ou apenas HPJ (Lutz, 1919; modificado por Hoffman *et al.*, 1934) e o Centrífugo-sedimentação (MIFC) ou método de Blagg (Blagg *et al.*, 1955), os quais permitem a pesquisa de vários parasitos intestinais, e devido ao baixo custo e simplicidade operacional são amplamente utilizados na rotina laboratorial.

Os métodos quantitativos, por sua vez, são caracterizados pela capacidade de se precisar a quantidade de ovos eliminados por grama de fezes, o que permite estimar a intensidade da carga parasitária do hospedeiro (Tabela 01). Destacam-se os métodos Kato-Katz (Kato & Miura, 1954; modificado por Katz *et al.*, 1972), Gradiente Salino (Coelho *et al.*, 2009) e Helmintex® (Teixeira *et al.*, 2007).

Tabela 1: Classificação da intensidade das infecções por *S. mansoni* com base no número de ovos eliminados por grama de fezes.

Intensidade da Infecção	Número de ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados por grama de fezes
Leve ou Baixa	1 – 99
Moderada ou Média	100 – 399
Intensa ou Alta	≥ 400

Fonte: WHO, 2002 – Adaptado.

Para a realização do método Kato-Katz é feita a coleta de uma única amostra fecal, a partir da qual é produzida uma lâmina com, aproximadamente, 42mg de fezes a ser lida em microscopia ótica. É considerado como positivo aquele indivíduo, em cuja amostra for encontrado ao menos um ovo de *S. mansoni*, ao passo que a ausência de ovos caracteriza o indivíduo como negativo. Todavia, deve-se ressaltar que o fato do exame parasitológico ser dado como negativo, não significa, necessariamente, a ausência de infecção (Chieffi *et al.*, 1978). Sendo assim, o método de Kato-Katz é capaz de diagnosticar, de modo eficaz, infecções moderadas e intensas, o que não ocorre quando há uma reduzida eliminação de ovos como nas infecções com baixa carga parasitária (De Vlas & Gryssels, 1992). Estudos têm demonstrado que ao aumentar o número de amostras ou lâminas analisadas, bem como a combinação de diferentes métodos, em áreas de média e baixa endemicidade (Enk *et al.*,

2008; Siqueira *et al.*, 2011) ou em pacientes com leve e moderada infecção (Utzinger *et al.*, 2000), há um aumento da prevalência quando comparado à avaliação de uma única amostra fecal, a qual tenha originado uma única lâmina. Nestes estudos foram relatadas áreas endêmicas, onde a prevalência da esquistossomose foi estimada em 8%, a partir da análise de uma amostra com uma única lâmina e, posteriormente, em 27,2% quando analisadas várias lâminas, oriundas de várias amostras e atingindo o valor de 35,8% quando combinado vários métodos de diagnóstico (Enk *et al.*, 2008). Fato similar foi observado ao aumentar o número de amostras, de indivíduos com leve ou moderada infecção, no qual a prevalência, a partir de uma única amostra, elevou de 58,1%, para 76,7% com a análise de quatro amostras (Utzinger *et al.*, 2000).

O método gradiente salino consiste na purificação de 500mg de fezes, por meio de um fluxo lento e contínuo de solução salina 3% ao longo de um intervalo de 60 minutos. O aprimoramento do equipamento, nos últimos anos, promoveu uma redução do custo e o aumento da praticidade em trabalhos de campo. Além disso, o aprimoramento permitiu a purificação simultânea de até 12 amostras, sendo que cada amostra contém material equivalente a 12 lâminas de Kato-Katz. Dessa forma, o método é capaz de processar amostras equivalentes a 144 lâminas (12 lâminas x 12 amostras) por hora. A grande quantidade de material fecal processado e o elevado número de lâminas têm alcançado, no campo, uma sensibilidade maior do que a observada com o método Kato-Katz (Coelho *et al.*, 2009).

O Helmintex®, por sua vez, baseia-se na análise de 30g de cada amostra fecal, as quais são submetidas à repetidos processos de filtração e sedimentação e, posteriormente, combinadas com esferas paramagnéticas (Teixeira *et al.*, 2007). Desse modo, a amostra torna-se mais límpida, o que facilita a leitura em microscopia ótica. Apesar de ser um método inadequado tanto para a atividade de campo quanto para a realização de exames rotineiros, o método tem sido testado nos laboratórios acadêmicos, e os resultados, até então publicados, vêm demonstrando uma elevada sensibilidade quando comparado com o método de Kato-Katz (Caldeira *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012).

1.4.2 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos consistem na detecção de anticorpos ou antígenos circulantes, e apesar de, em alguns casos, demandar laboratórios com equipamentos de alta complexidade e pessoal treinado, têm se apresentado como possíveis substitutos aos exames parasitológicos de fezes. Isto porque os métodos parasitológicos apresentam limitações no diagnóstico de indivíduos com infecções de baixa intensidade e também seguem metodologias relativamente demoradas (Hamilton *et al.*, 1998; Van Lieshout *et al.*, 2000; Doenhoff *et al.*, 2004).

A dosagem sorológica dos antígenos circulantes [Antígenos Anódicos Circulantes (CAA) e Antígenos Catódicos Circulantes (CCA)] de *S. mansoni*, apesar de altamente específica, também não é suficientemente sensível para detectar indivíduos com baixa carga parasitária, utilizando-se os métodos sorológicos para captura de antígenos (Rabelo, 1997; Gryssels, 2012), uma vez que a pequena quantidade de antígenos circulantes se diluiria fortemente no grande volume sanguíneo humano resultando em uma fraca reatividade ao exame. Esses antígenos são regurgitados pelo parasito, em intervalos regulares, junto às partículas não digeridas em seu processo nutricional (van Dam *et al.*, 2004). No entanto, foi observado que o CCA, embora presente no soro, é melhor detectado na urina e que a sua concentração reduz rapidamente (uma semana) após o tratamento quimioterápico (Van't Wout *et al.*, 1992; Van Lieshout *et al.* 1993), o que significa que somente indivíduos com infecção ativa são detectados. Logo, a detecção dos antígenos catódicos circulantes, eliminados na urina, vem se apresentando como uma possível alternativa no diagnóstico para infecções por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Deelder *et al.*, 1989; De Jonge *et al.*, 1990; Kremsner *et al.*, 1994; Van Etten *et al.* 1994). Isso porque amostras urinárias de pacientes positivos para esquistossomose, quando submetidas ao teste CCA dotado de anticorpos monoclonais, têm apresentado uma satisfatória captura do antígeno, principalmente em pacientes com altas e moderadas infecções (Adriko *et al.*, 2014). As principais desvantagens desse tipo de ensaio se devem a baixa sensibilidade em áreas de baixa endemicidade e especialmente em casos de infecções de leve intensidade (De Jonge *et al.*, 1990).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil ainda existem inúmeras áreas de baixa e média transmissão da esquistossomose mansoni (WHO, 2013). Contudo, no intuito de controlar e erradicar a doença, o uso do fármaco Praziquantel como meio de tratamento e quimioterapia preventiva tem sido adotado há alguns anos (WHO, 2006). Essa medida contribuiu para reduzir não só a endemicidade, mas também a intensidade das infecções por *S. mansoni*, o que também ocorre quando estes indivíduos tratados são re-infectados. Essa imunidade adquirida à infecção pode ser explicada pelo balanço entre as respostas imunes Th1 e Th2, além de baixos níveis de IgG4 contra antígenos solúveis do parasito (Oliveira, 2012). Desse modo, têm se observado uma diminuição do número de ovos eliminados por grama de fezes, por parte desses indivíduos.

Entretanto, apesar do método Kato-Katz, recomendado pela OMS, ser eficaz no diagnóstico em áreas de média e alta endemicidade, este possui uma baixa sensibilidade quando utilizado em áreas de baixa endemicidade ou em indivíduos com infecções de leve intensidade (Enk *et al.*, 2008), pois o reduzido número de ovos eliminados nas fezes dificulta o diagnóstico.

Os métodos imunológicos, por sua vez, vêm se apresentando como uma possível alternativa para o diagnóstico dos indivíduos residentes em áreas de baixa endemicidade ou com reduzida carga parasitária. No entanto, são falhos no quesito de distinguir uma infecção ativa ou curada, além de haver a possibilidade de reação cruzada com outros helmintos (Rabelo *et al.*, 2008).

Sendo assim, para que se possa controlar e até eliminar o parasito em áreas de baixa transmissão e de infecções de baixa intensidade é necessária a utilização, a nível individual, de métodos parasitológicos e imunológicos de alta sensibilidade e especificidade, a fim de se obter uma correta identificação dos indivíduos infectados para que os mesmos possam ser devidamente tratados e acompanhados (WHO, 2002).

Neste contexto, o presente estudo se justifica pelo fato da necessidade de avaliar métodos ou combinações de métodos tradicionais e recém-desenvolvidos em áreas de baixa endemicidade e/ou carga parasitária reduzida, para indicar técnicas com melhor ‘desempenho’ (alta sensibilidade e especificidade) e avançar no controle da esquistossomose. Além disso, o aprimoramento também visa o desenvolvimento de métodos de baixo custo e praticidade em sua realização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar e comparar a sensibilidade entre diferentes métodos diagnósticos [Centrífugo-sedimentação, Gradiente Salino, Helmintex, Kato-Katz e Teste Rápido de Urina (POC-CCA)] em uma área de média endemicidade para esquistossomose mansoni.

3.2 Objetivos Específicos

- Detectar a prevalência real da esquistossomose mansoni numa área rural do distrito de Brejo do Amparo, Município de Januária, Minas Gerais, Brasil;
- Avaliar o desempenho do método parasitológico de fezes Kato-Katz no diagnóstico do trematódeo *S. mansoni*, em relação à variação do número de amostras e lâminas utilizadas, em comparação com o modelo proposto pela OMS e com os outros métodos avaliados neste estudo;
- Avaliar o desempenho dos métodos parasitológicos de fezes (Centrífugo-sedimentação, Gradiente salino e Helmintex®) para o diagnóstico do parasito *S. mansoni* em comparação ao método de Kato-Katz;
- Avaliar o desempenho do Teste rápido de urina para antígeno catódico circulante (CCA) de *S. mansoni* em comparação com o método de Kato-Katz e;
- Avaliar diferentes combinações entre os testes de diagnóstico para esquistossomose, para indicar os métodos que alcançam a melhor sensibilidade.

4 MATERIAL E METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada na zona rural do Distrito de Brejo do Amparo (15°25'54'' S e 44°24'42'' O), região endêmica para a esquistossomose mansoni do município de Januária, situado na região norte do estado de Minas Gerais e que dista a 603 km da capital do estado, Belo Horizonte.

O distrito possui clima tropical e registra temperaturas que variam dos 12,6°C aos 38°C. As chuvas são escassas e irregulares. Embora se estendam de outubro a meados de fevereiro, os maiores índices pluviométricos são registrados, predominantemente, no verão. A população estudada reside na região dos córregos rurais (Pé da Serra, Tocantins e Santana), com aproximadamente 270 habitantes, e possui como principal atividade econômica o cultivo de cana-de-açúcar, milho e feijão. A maioria dos domicílios cadastrados está situada ao longo de uma estrada não pavimentada, que possui à sua margem um riacho de águas perenes, onde em vários pontos foram encontrados pequenas populações de caramujos *Biomphalaria glabrata*.

A população foi escolhida baseada na sugestão do serviço de saúde pública do município, visto que apesar dos funcionários do PCE e da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) terem realizado o diagnóstico e tratamento dos moradores, nos últimos quatro anos, ainda havia vários relatos de transmissão ativa da esquistossomose na localidade. O serviço de saúde também havia informado que o riacho da localidade era utilizado pelos moradores para retirar água para o consumo doméstico e irrigação das plantações; tomar banho; lavar roupas, utensílios de cozinha, animais e praticar atividades recreativas (pesca e natação) (Figura 04).



Figura 4: Córrego Tocantins situado no distrito de Brejo do Amparo, Município de Januária – MG, onde os moradores lavam roupas e utensílios de cozinha (a) ou tomam banho (b).
Fonte: fotos cedidas por Dr. Stefan Michael Geiger.

4.2 Facilitadores do estudo

Com o objetivo de se alcançar uma melhor relação com os moradores, o projeto contou com a colaboração de duas agentes comunitárias de saúde (ACS) e de vários líderes comunitários que atuaram como intermediadores entre pesquisadores e moradores.

4.3 População de estudo

Inicialmente, foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão para uma melhor definição da população de estudo. Foram incluídos todos os indivíduos que, após terem sido bem orientados sobre os procedimentos da pesquisa, desejaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em contrapartida, foram excluídos os pacientes com suspeita ou confirmação de gestação, saúde debilitada ou que se recusaram a participar.

Todos os participantes receberam duas cópias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual foi devidamente explicado aos participantes e/ou aos seus

responsáveis legais, e ainda, foram esclarecidas todas as dúvidas dos participantes, e assim, posteriormente os mesmos assinaram os termos. A primeira via ficou sob a responsabilidade do participante ou responsável legal e a segunda arquivada pelos pesquisadores envolvidos na pesquisa, como já estava estabelecido no projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE; parecer: 19354513.3.0000.5149).

Após a assinatura dos termos de consentimento foi iniciada a pesquisa do diagnóstico parasitológico dos pacientes, e, para isso, foram coletadas amostras de fezes e urina, as quais foram processadas e submetidas a diferentes métodos diagnósticos para a pesquisa de esquistossomose, sendo eles: Centrífugo-Sedimentação (MIFC ou de Blagg), Kato-Katz, Gradiente Salino, Helmintex®, Teste rápido de urina (POC-CCA). As amostras fecais e urinárias foram obtidas de todos os participantes, independente da faixa etária.

4.4 - Coleta, conservação e processamento das amostras

Para assegurar a qualidade das amostras coletadas, os pacientes foram previamente orientados pelos pesquisadores, a respeito do método de coleta empregado para obtenção das amostras de fezes e urina, bem como o esclarecimento da utilização de um recipiente específico para cada amostra e, ainda, a orientação sobre a armazenagem do material biológico até o momento da entrega aos pesquisadores. Todos os recipientes utilizados para armazenamento das amostras coletadas foram devidamente identificados com o nome completo e número de identificação, conforme ficha de cadastro elaborada pelo projeto, para cada indivíduo participante.

Devido à dificuldade de deslocamento enfrentado pelo paciente do seu domicílio até o centro de saúde mais próximo, e a fim de se alcançar uma maior adesão e também de proporcionar uma maior comodidade ao paciente, optou-se por realizar a coleta de todos os materiais no domicílio de cada paciente.

4.4.1 Fezes

Foram coletadas três amostras fecais no decorrer de três dias consecutivos, sendo que a primeira amostra foi utilizada na realização dos seguintes exames parasitológicos de fezes: Kato-Katz com 14 lâminas, gradiente salino, Helmintex® e centrífugo-sedimentação. A segunda e terceira amostra foram utilizadas para preparação de duas lâminas de Kato-Katz e,

posteriormente, misturadas à primeira amostra para a realização do método de centrífugo-sedimentação (Figura 05):

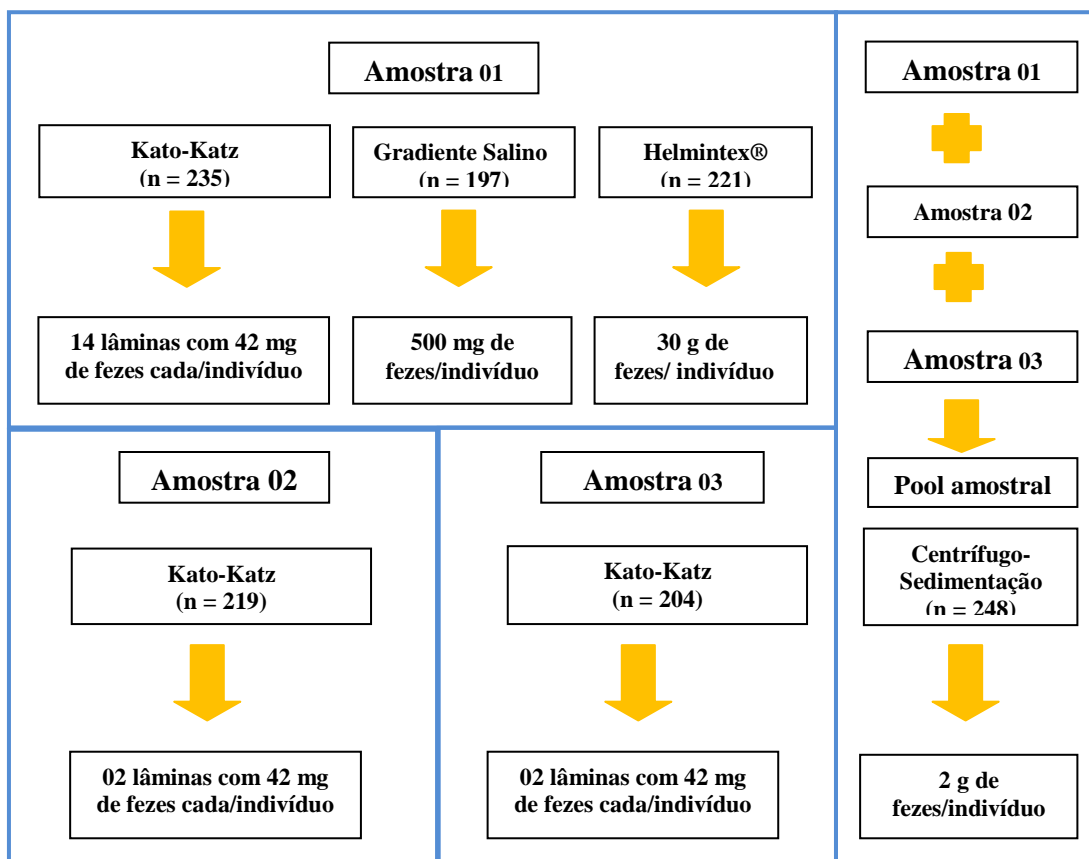


Figura 5: Métodos parasitológicos de fezes utilizados em cada amostra.

Sendo assim, da primeira amostra, necessitou-se de um grande volume fecal e, portanto, foi fornecido para cada paciente um pote com capacidade para uma evacuação total de 500 mL, estando o recipiente devidamente identificado com dados pessoais e cadastrais do participante. Na manhã seguinte o morador entregava a amostra e, então, recebia o recipiente para coleta da segunda amostra. No próximo amanhecer, o paciente novamente realizava a entrega do conteúdo fecal, ao passo que obtinha o pote para armazenamento da terceira amostra a ser devolvido no dia seguinte. Entretanto, como a quantidade de material fecal a ser utilizada das duas últimas amostras era menor, então, optou-se pela distribuição do coletor universal com capacidade de 80 mL (Diag Testi®), identificado da mesma forma que o pote de maior capacidade.

Todas as amostras, imediatamente após serem recolhidas, foram armazenadas em caixas de isopor, e em seguida, encaminhadas para processamento no laboratório do Centro de

Controle de Leishmaniose, situado na sede do Município de Januária. Nesse local, cada amostra recebida era cadastrada e, em seguida, processada de modo a originar lâminas e/ou sedimentos para leitura em microscopia ótica. O conteúdo excedente juntamente com o recipiente de coleta foi descartado em sacos plásticos identificados como material biológico infectante e encaminhados para o depósito de resíduos infectantes do Hospital Municipal de Januária.

4.4.2 Urina

Para a coleta do material urinário foi distribuído, a cada paciente, um coletor de amostras biológicas descartável com capacidade de 80 mL (Diag Testi®), previamente identificado com os dados pessoais e cadastrais do participante, no qual se recolhiam de 10-15 mL de urina da primeira micção no período da manhã. Na manhã seguinte, as amostras eram recolhidas e armazenadas em caixa de isopor. As amostras, então, eram encaminhadas para processamento no laboratório, onde eram transferidas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, para tubos de 1,5 e 15 mL, os quais eram armazenados em freezer à -20°C. O restante do conteúdo líquido foi descartado em vaso sanitário e os coletores depositados em sacos plásticos brancos, devidamente identificados como material biológico infectante e encaminhados para o depósito de resíduos infectantes do Hospital Municipal de Januária.

4.5 Identificação dos indivíduos positivos para esquistossomose mansoni

4.5.1 Método Kato-Katz (Kato, 1954, modificado por Katz et al., 1972)

A partir desse método foram produzidas, para cada paciente, 18 lâminas de microscopia ótica. Sendo que a primeira amostra originou 14 lâminas, enquanto que a segunda e terceira amostra forneceram material fecal para a geração de mais duas lâminas, cada.

Todas as lâminas foram produzidas, por meio da utilização do HELM TEST - Bio-Manguinhos que é um teste qualitativo-quantitativo para detecção parasitológica de verminoses baseado no método desenvolvido por Kato & Miura (1954) e, posteriormente, aprimorado por Katz e colaboradores (1972). De acordo com o método Kato-Katz, e das

orientações do protocolo fornecido pelo fabricante, a preparação das lâminas ocorreu da seguinte forma:

Separaram-se as lamínulas, na quantidade necessária para o processamento das amostras coletadas, e as mesmas foram depositadas em um recipiente, no qual foi adicionado uma solução diafanizadora (verde de malaquita) de modo a deixar todas as lamínulas embebidas, por um período mínimo de 24 horas. No dia seguinte, foi utilizado papel higiênico, o qual foi dobrado em 4 ou 5 partes e deixado sobre uma superfície limpa, seca e plana. Em seguida, homogeneizaram-se as fezes com o auxílio de uma espátula e colocou-se parte da amostra sobre o papel higiênico já dobrado. A amostra fecal, então, foi comprimida por meio de um fragmento de tela metálica, de modo a permitir a passagem de ovos de helmintos e detritos de tamanho inferior ou igual ao dos ovos de *S. mansoni*. Com o outro lado da espátula, o material fecal que atravessou a tela metálica foi recolhido e transferido para o orifício de uma placa de plástico perfurada (cartão plástico de formato retangular com um orifício central de 6 mm de diâmetro) que estava apoiada sobre a superfície de uma lâmina de vidro (Figura 06).

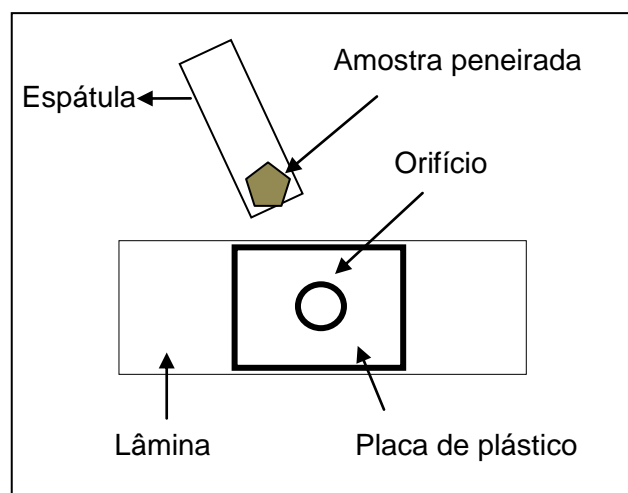


Figura 6: Transferência do conteúdo fecal, peneirado, para a lâmina de vidro através do orifício da placa de plástico.

Foi realizada ainda a compressão das fezes no interior do orifício e também a retirada do excesso de material que ficou acima do nível da placa perfurada, no intuito de se alcançar a padronização da quantidade de fezes utilizada na montagem de cada lâmina em,

aproximadamente, 42 mg. Na continuação do procedimento, a placa perfurada foi retirada cuidadosamente e a lamínula foi posta sobre o material fecal. A lâmina, então, foi girada em 180°, de modo que a lamínula ficasse na face inferior da lâmina, e assim, a lâmina foi pressionada com o dedo polegar contra uma superfície seca e plana até que toda a amostra fecal se espalhasse homogeneamente sobre todo o espaço existente entre a lâmina e lamínula. Decorrido o prazo mínimo de 60 minutos, a amostra foi examinada através da microscopia ótica a fim de se observar a presença e quantidade de ovos de helmintos em cada lâmina (Figura 07).

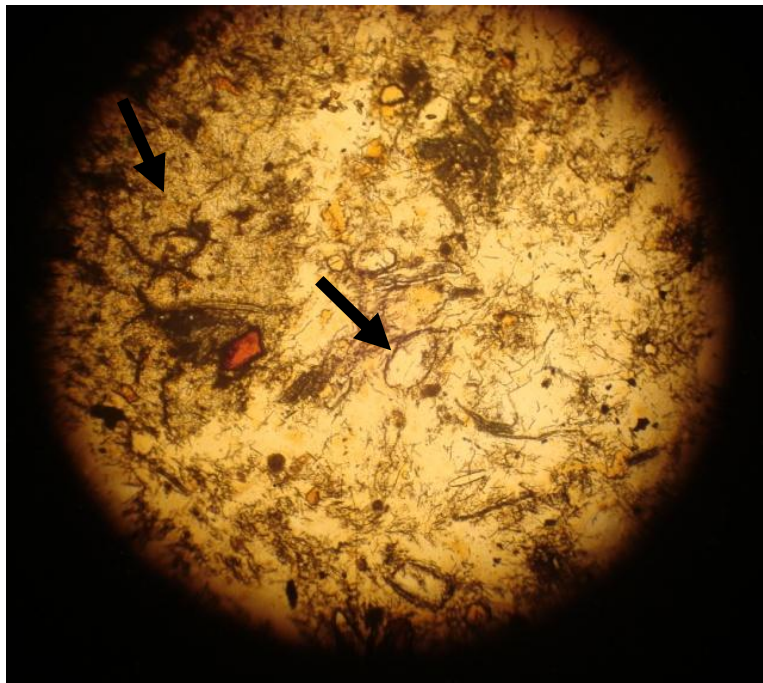


Figura 7: Lâmina de Kato-Katz, na qual são observados ovos de *S. mansoni* (seta), através de microscopia ótica. Fonte: arquivo pessoal do autor.

Para a análise quantitativa, foi realizada a contagem de todos os ovos presentes na preparação e multiplicados por 24. A justificativa para tal cálculo é que cada lâmina possui 42 mg de fezes, conforme padronização já explicitada acima, e ao ser multiplicado por 24 obtém-se o valor aproximado de 1 grama de fezes ($42\text{mg} \times 24 = 1,008\text{g}$). Sendo assim, o número ou a média de ovos por lâmina multiplicados por 24 resulta no número de ovos por grama de fezes (OPG). Foram lidas, no mínimo, duas lâminas por amostra fecal e o valor total de OPG resultou da média de OPG em todas as lâminas lidas. A análise qualitativa, por sua vez, foi

realizada por meio da observação e contabilização dos diferentes ovos de helmintos encontrados durante a leitura das lâminas. Embora os examinadores das lâminas tenham sido previamente treinados para realizar tal atividade, ao menos 20% das lâminas foram reavaliadas por outro examinador, no intuito de se confirmar o diagnóstico dado.

4.5.2 Método Centrífugo-Sedimentação - MIFC (Blagg et al., 1955)

Para a realização desse método inicialmente se homogeneizou as três amostras fecais, com o auxílio de uma espátula, e de cada amostra se retirou 2 gramas de fezes. Essas porções foram misturadas entre si e, após homogeneização, retirou-se 2 gramas do homogeneizado e, nesta porção, se acrescentou o líquido conservante de MIF (Mertiolato ou Mercurocromo, Iodo e Formol 10%). A utilização desta solução é necessária para que haja a conservação dos cistos e oocistos de protozoários, bem como de ovos e larvas de helmintos. A solução pode ser preparada da seguinte forma:

- Água destilada..... 250 mL
- Solução de mercurocromo a 1:500 250 mL
- Formol comercial 25 mL
- Glicerina 5 mL

Na sequência a amostra foi transferida para um recipiente com capacidade para 200 mL, onde se acrescentaram 50 mL de MIF, a fim de conservar o material fecal. O conteúdo, então, foi filtrado, através de gaze cirúrgica dobrada em quatro partes, e coletado em outro cálice cônico de 200 mL. Do filtrado, foram retirados de 1-2 mL, os quais foram transferidos para um tubo cônico de centrifugação, com capacidade de 15 mL, identificado com o nome e número de registro do paciente. Nesse tubo, foram acrescentados e homogeneizados 4-5 mL de éter sulfúrico e, posteriormente, centrifugados a 1.500 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos. Após a centrifugação, com o auxílio de uma espátula, os detritos que haviam se aderido às paredes do tubo foram retirados e, em seguida, o mesmo foi girado em 180°, de modo que a abertura do tubo ficasse voltada para baixo, permitindo que todo o líquido fosse descartado. Caso ainda houvesse detritos aderidos às paredes do tubo, esses eram retirados com o auxílio de uma espátula ou bastão com algodão enrolado em sua extremidade. Dessa forma, apenas o sedimento ficava no tubo, no qual eram acrescentadas algumas gotas de PBS

7,2%. O conteúdo foi novamente homogeneizado com o auxílio de uma pipeta e, em seguida, foi transferida uma gota desse conteúdo para uma lâmina de vidro. Posteriormente foi recolhido mais uma gota que foi transferida para uma segunda lâmina, de modo a serem produzidas duas lâminas de cada amostra. Para a realização da leitura adicionou-se uma gota de lugol a cada lâmina e a mesma foi encoberta com lamínula de vidro, e, em seguida, a lâmina montada foi levada ao microscópio óptico para a realização da leitura através das objetivas de 10x e/ou 40x.

4.5.3 Método Gradiente Salino (Coelho et al, 2009)

Para a realização desse método diagnóstico é necessário o auxílio de um equipamento produzido especificamente para esta metodologia. Esse dispositivo básico é composto por dois tubos cilíndricos transparentes que, embora estejam interligados, possuem capacidades volumétricas diferentes e ficam posicionados em alturas distintas. O cilindro maior (coluna reservatório) possui capacidade para 50 mL e está situado acima do recipiente menor (coluna de separação), cuja capacidade é de 10 mL e está posicionado de modo que a sua extremidade superior esteja sempre ao nível da extremidade inferior do tubo maior. Os dois cilindros são interligados por uma mangueira de borracha de, aproximadamente, 70 cm, cujo fluxo volumétrico é controlado por meio da utilização de um regulador de fluxo de modo a manter um padrão de gotejamento (1 mL = 20 gotas/minuto). Na porção inferior do cilindro menor há um filtro com 1 cm de espessura, o qual é selado com silício. Já na porção superior há uma mangueira de drenagem pela qual o excesso de líquido é eliminado para o compartimento coletor (Figura 08).

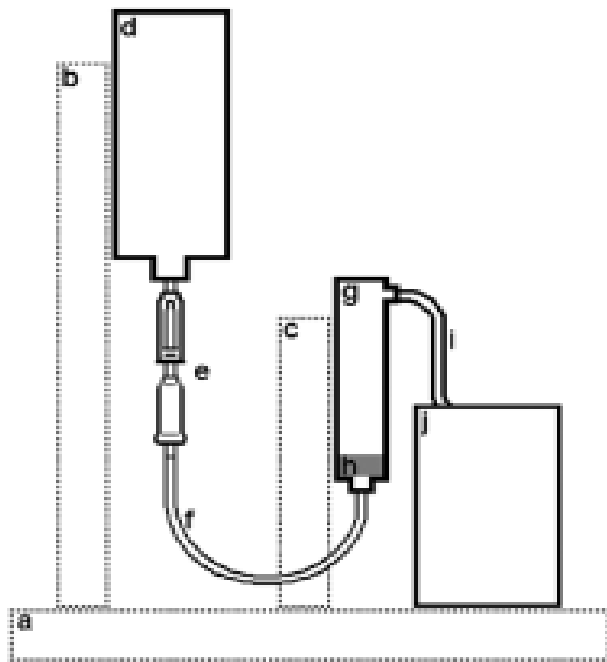


Figura 8: Desenho esquemático da região lateral do equipamento utilizado no processamento das amostras, por meio do método gradiente salino. a) base; b) suporte do reservatório maior; c) suporte do reservatório menor; d) reservatório maior; e) regulador do fluxo. Fonte: Coelho *et al.*, 2009 – Adaptado.

Para que um maior número de exames pudesse ser realizado simultaneamente, o dispositivo básico foi aprimorado de modo que, atualmente, 12 amostras podem ser processadas ao mesmo tempo. Para isso, o cilindro de 50 mL foi substituído por uma coluna reservatório com capacidade para 3 litros, a qual é preenchida com solução salina 3%. Além disso, a nova coluna reservatório foi conectada a 12 colunas de separação, as quais não tiveram a capacidade de armazenamento alterada (Figura 09).

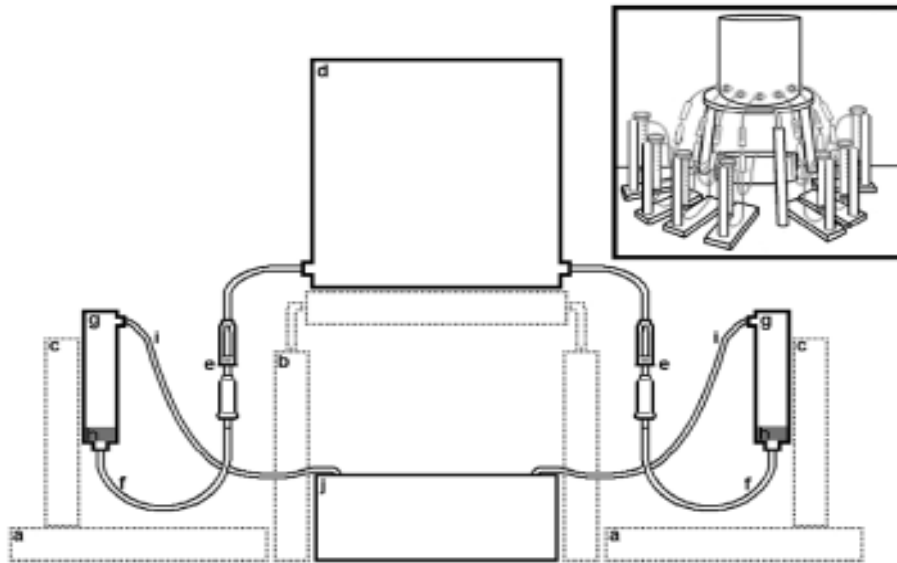


Figura 9: Equipamento utilizado na realização do método gradiente salino aprimorado. Desenho esquemático da vista lateral, no qual somente dois dos 12 reservatórios de separação estão representados. Fonte: Coelho *et al.*, 2009 - Adaptado.

O desenvolvimento do método ocorre da seguinte forma: a coluna de separação é pré-umedecida, por meio da liberação da solução salina 3% presente na coluna reservatório, através do afrouxamento da roldana do regulador de fluxo. Em seguida, rola-se a roldana de forma a clampar o regulador de fluxo e assim, impedir a saída da solução salina. Com o auxílio de uma pipeta, descarta-se o excesso da solução presente sobre a superfície do filtro poroso da coluna de separação. Ainda com o auxílio de uma pipeta, preenche-se totalmente a coluna de separação com uma amostra fecal, previamente preparada. Essa alíquota fecal é produzida a partir de 500 mg de fezes, a qual é diluída em 3 mL de solução salina a 0,85%. Posteriormente, afrouxa-se a roldana do regulador de fluxo de modo a se alcançar o padrão de fluxo da solução salina em 10 gotas/minuto. Esse ajuste de gotejamento é realizado para tornar o fluxo da solução salina 3%, do compartimento maior para o compartimento menor, lento e contínuo. Desse modo, os resíduos de baixa densidade são suspensos e eliminados através da mangueira de drenagem presente na extremidade superior da coluna de separação.

Em contrapartida, os ovos dos helmintos, por apresentarem uma alta densidade, se sedimentam no fundo do recipiente. Dessa forma, após um período aproximado de 20-60 minutos se obtém uma amostra fecal de maior pureza, a partir da qual serão preparadas doze lâminas. Nesse processo de preparação adiciona-se uma gota de lugol na lâmina com a

amostra e, em seguida, a recobre com uma lamínula de vidro. Realizadas tais etapas, a lâmina é lida em microscópio óptico utilizando as objetivas de 10x e/ou 40x.

4.5.4 Método *Helmintex*® (Teixeira, 2007)

Para a execução do método *Helmintex*® foram utilizados 30g de fezes, os quais foram transferidos para um recipiente limpo, onde se adicionou solução formol 10%. Na sequência, a mistura foi homogeneizada e, então, se deu o início da tamisação do homogeneizado de fezes através de uma tela de nylon (500 µm) sobreposta a um recipiente coletor. Para auxiliar esta etapa foi utilizada uma espátula e água destilada. Em seguida, a amostra foi sedimentada espontaneamente por uma hora em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo estipulado, o sobrenadante foi desprezado e, em seguida, adicionou-se água destilada. Novamente a amostra foi sedimentada espontaneamente e o sobrenadante descartado e assim se repetiu essa etapa até o sedimento tornar-se límpido. Quando se obteve o sedimento límpido realizaram-se novas tamisações, utilizando tamises nas espessuras de 100 (S1), 200 (S2) e 325 (S3) fios por polegada quadrada, respectivamente. Posteriormente, realizou-se a ressuspensão do material retido na malha S3 com água destilada e deixou-se sedimentar espontaneamente por uma hora, e, em seguida, recolheu-se o sedimento e o mesmo foi submetido ao método de Ritchie (Ritchie, 1948) até que o material se tornasse límpido.

Esse sedimento obtido foi ajustado até o volume de 1,5 mL e transferido para microtubos, sobre os quais foram adicionados 19 µL de suspensão contendo esferas paramagnéticas. Esses microtúbulos foram incubados e agitados por uma hora, com o auxílio do agitador orbital (Phoenix) à temperatura ambiente. Na sequência, o microtúbulo no qual estava presente a solução previamente preparada foi conectado ao magneto (BioMag®) durante 3 minutos. O sobrenadante obtido foi desprezado e recolheu-se o sedimento que ficou aderido à parede do microtubo e o mesmo foi colocado sobre uma lâmina de vidro que foi levada ao microscópio óptico para ser realizada a identificação e contagem dos ovos de *Schistosoma mansoni* presentes na amostra.

4.5.6 Teste Rápido Urina (POC-CCA)

O teste rápido Urina (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul) é um método qualitativo, o qual permite a detecção de infecções ativas por *S. mansoni*, de modo mais específico. Entretanto, o teste também pode ser utilizado na detecção de infecções por outras espécies tais como *S. haematobium* e *S. japonicum*. Este método foi utilizado no teste de 194 amostras de urina, o que demandou a aquisição de 8 kits compostos por: 25 Placas plásticas; 1 frasco contendo 3 mL de tampão, 25 pipetas plásticas e um manual de instrução. Na extremidade anterior de cada placa plástica há um poço circular, onde a amostra é adicionada. Com o decorrer do tempo, a urina é absorvida e distribuída por toda a extensão de uma tira de papel, presente no interior da placa, o que pode ser observado através da abertura retangular na porção central da placa.

Para a realização do método, a amostra foi homogeneizada e, com o auxílio de uma pipeta plástica, retirou-se uma gota de urina, a qual foi transferida para o poço circular da placa plástica. Após a gota se distribuir por toda a placa, adicionou-se uma gota da solução tampão. Decorridos exatos 20 minutos, realizou-se a leitura da placa. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: a) inválido: linha de controle (C) na cor azul ou linha de controle ausente, mas com linha teste (T) rosada; b) negativo: linha C na cor rosa e ausência da linha T; c) Positivo - Traço: linha C na cor rosa e linha T muito fracamente rosada; d) Positivo simples (+1): linha C na cor rosa e linha T fracamente rosada; e) Positivo duplo (+2): linha de C na cor rosa e linha T rosada e; f) Positivo triplo (+3): linha C na cor rosa e linha T fortemente rosada (Figura 10). Os casos classificados como Traço foram considerados como positivo, pois a sua negatificação faz com que o método não mais seja uma alternativa ao método Kato-Katz (Adriko et al., 2014).

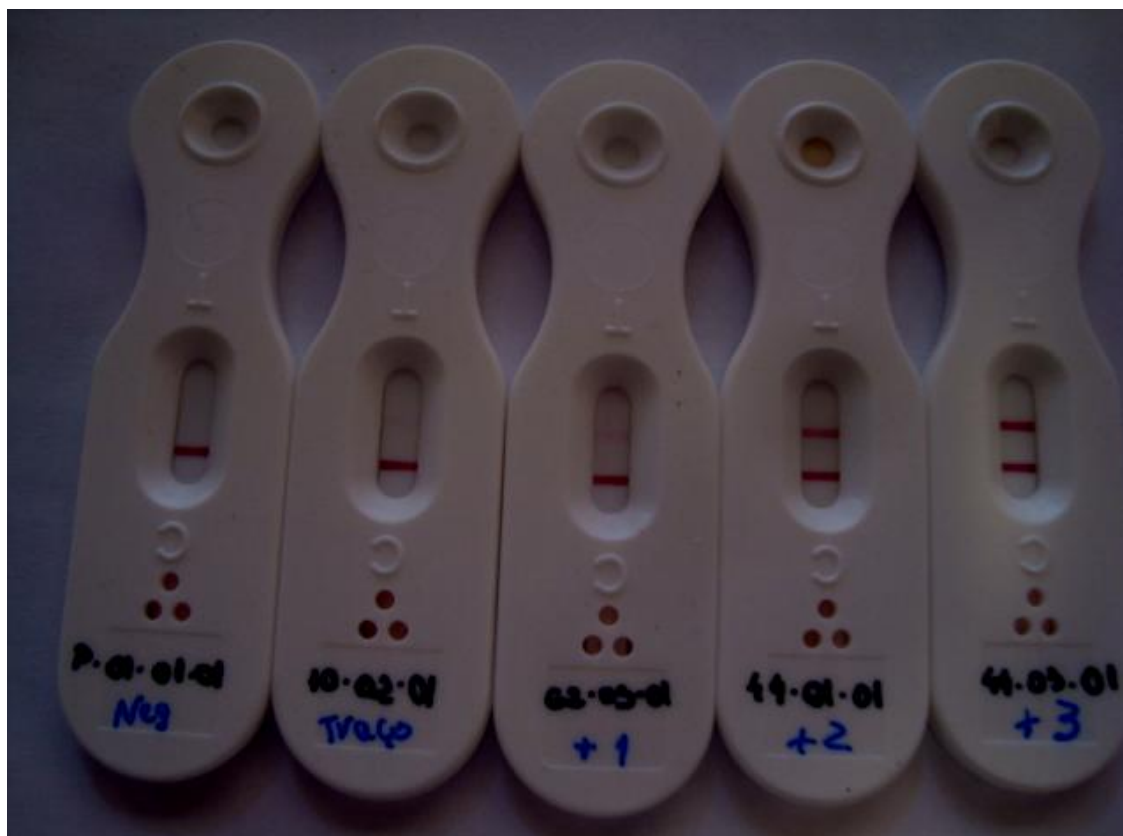


Figura 10: Interpretações dos testes rápidos de urina, de acordo com cada padrão de bandeamento. Os números superiores (cor negra) referem-se à identificação do paciente e os inferiores (cor azul) ao diagnóstico. Da esquerda para a direita: Negativo (Neg): linha C (inferior) rosada e linha T (superior) ausente. Positivo - Traço: linha C rosada e linha T muito fracamente rosada. Positivo simples (+1): linha C rosada e linha T fracamente rosada. Positivo duplo (+2): linha C e linha T rosadas. Positivo triplo (+3): linha C rosada e linha T fortemente rosada.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi do tipo não paramétrica, sendo que os testes do Qui-quadrado, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$, e McNemar foram utilizados para se avaliar a relação de dependência ou não, entre as variáveis consideradas no presente estudo. As análises foram realizadas por meio do programa on-line OpenEpi versão 3.03, enquanto que para a elaboração dos gráficos foram utilizados os programas GraphPad Prism 5 e Microsoft Office Excel 2007.

4.6.1 “Padrão Ouro”, Prevalência e Taxa de positividade

O “Padrão Ouro” foi estabelecido como a soma do número de positivos encontrados nos quatro métodos parasitológicos de fezes (Centrífugo-Sedimentação, Gradiente salino, Helmintex® e Kato-Katz). O valor encontrado foi utilizado como referência para análise dos métodos utilizados.

A prevalência da esquistossomose, no distrito de Brejo do Amparo, foi determinada a partir do número total de pacientes positivos para *S. mansoni* obtido pelo “Padrão Ouro”, o qual foi dividido pelo número total de pacientes participantes da pesquisa.

A taxa de positividade indica a porcentagem de indivíduos positivos, diagnosticada por cada método ou combinação, em relação ao total de indivíduos positivos diagnosticados pelo “Padrão Ouro”. Portanto, essa taxa foi obtida a partir do número de indivíduos positivos, diagnosticados por técnica ou por cada variação do método Kato-Katz (combinações do número de lâminas e/ou amostras lidas) ou por combinação de técnicas, dividido pelo total de positivos identificados pelo “Padrão Ouro”.

4.6.2 Parâmetros estatísticos utilizados na validação dos métodos

Os métodos diagnósticos podem apresentar quatro situações merecedoras de reflexão para fins de diagnóstico, sendo elas (Tabela 02):

Verdadeiro Positivo (VP) → O teste é positivo e o indivíduo efetivamente tem a infecção.

Falso Positivo (FP) → O teste é positivo, mas o indivíduo não está infectado.

Verdadeiro Negativo (VN) → O teste é negativo e o paciente, de fato, não tem a infecção.

Falso Negativo (FN) → O teste é negativo, mas o indivíduo tem a infecção.

Os parâmetros estatísticos utilizados na validação dos métodos de diagnóstico foram especificidade, sensibilidade, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo, os quais foram obtidos de acordo com a tabela 02.

Especificidade (E): Probabilidade do teste ser negativo dado que o paciente não está infectado.

Sensibilidade (S): Probabilidade de o teste ser positivo dado que o paciente está infectado.

Valor Preditivo Negativo (VPN): Mede a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Logo, o VPN indica a probabilidade de um indivíduo com teste negativo não estar infectado.

Valor Preditivo Positivo (VPP): Mede a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste diagnóstico positivo. Logo, ele indica a probabilidade de um indivíduo com teste positivo estar realmente infectado.

Tabela 2: Tabela 2x2 e os principais dados estatísticos (Sensibilidade; Especificidade; VP – Verdadeiro Positivo; VN – Verdadeiro Negativo; FP – Falso Positivo; FN – Falso Negativo; VPP – Valor Preditivo Positivo; VPN – Valor Preditivo Negativo) utilizados na análise dos resultados.

Teste diagnóstico	"Padrão Ouro"		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	VP (a)	FP (b)	(a + b)
Negativo	FN (c)	VN (d)	(c + d)
Total	(a + c)	(b + d)	(a + b + c + d)
Especificidade: $\frac{d}{c + d}$		Sensibilidade: $\frac{a}{a + b}$	
Valor Preditivo Negativo: $\frac{d}{b + d}$		Valor Preditivo Positivo: $\frac{a}{a + c}$	

4.6.3 Concordância diagnóstica

Para a determinação do grau de concordância entre os métodos diagnósticos foi utilizado o índice Kappa (não ponderado), o qual varia de 0 – 1. Para uma melhor classificação do grau de concordância, foi adotada a seguinte subdivisão do índice Kappa: a) *nenhum acordo*: quando índice for menor que 0,01; b) *ruim*: quando índice for entre 0,01 e 0,20; c) *fraca*: quando entre 0,21 – 0,40; d) *moderada*: quando entre 0,41 e 0,60; e) *boa*: quando entre 0,61 e 0,80 e; f) *excelente*: quando maior que 0,81 (Landis & Kock, 1977).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil populacional e prevalência

A partir dos dados (gênero e idade) obtidos durante o cadastramento dos participantes do estudo foi traçado um perfil epidemiológico da população em estudo.

O estudo contou com a participação de 257 indivíduos, dos quais 122 (47,47%) eram do sexo masculino e 135 (52,53%) feminino (Figura 11).

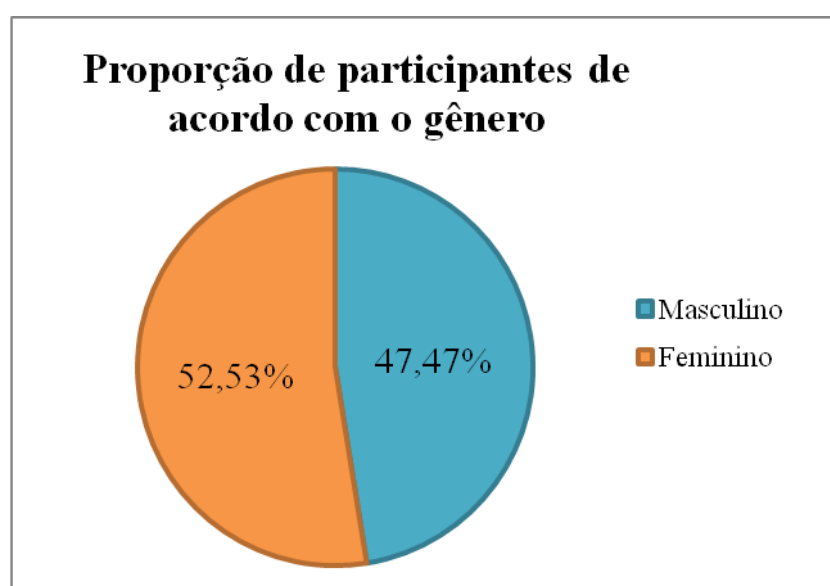


Figura 11: Perfil da população em estudo de acordo com a porcentagem de indivíduos do gênero masculino e feminino.

A média de idade dos indivíduos participantes foi de 34,5 anos, enquanto que a de homens infectados foi igual à 35,3 anos e a de mulheres igual a 34,7 anos. A proporção de participantes de acordo com cada faixa etária foi calculada e os resultados compilados (Figura 12).

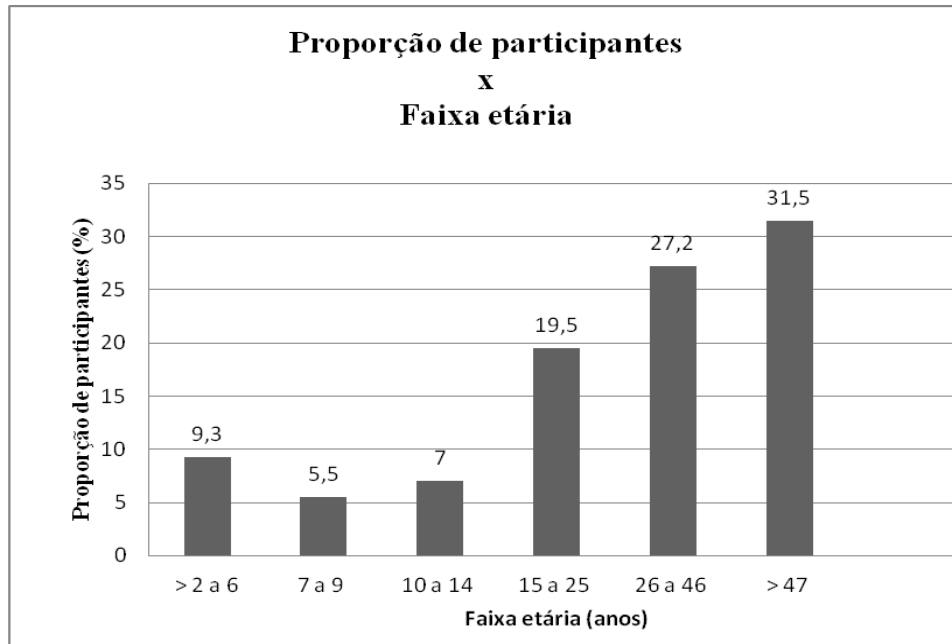


Figura 12: Proporção de indivíduos participantes em relação às diferentes faixas etárias.

A prevalência da esquistossomose, obtida a partir do “Padrão Ouro” (somatório dos pacientes positivos para os métodos Centrífugo-Sedimentação, Gradiente salino, Helmintex® e Kato-Katz com 14 lâminas de uma mesma amostra, acrescido de mais duas lâminas produzidas a partir de cada uma das outras duas amostras fecais) foi de 45,91%, ou seja, 118 positivos em 257 indivíduos. Essa prevalência será utilizada como referência na avaliação comparativa de todos os métodos empregados na pesquisa.

Dentre os 118 indivíduos positivos para *Schistosoma mansoni*, 55 (46,6%) eram do sexo masculino, enquanto que 63 (53,4%) eram do sexo feminino. Entretanto, a proporção de homens positivos foi de 45,08% (55/122), ao passo que a de mulheres positivas foi de 46,7%. Ao analisar a prevalência da esquistossomose em razão da faixa etária, notou-se que o intervalo de 10 a 14 anos foi aquele que apresentou a maior prevalência (61,10%), enquanto que nos intervalos de 15 a 25 anos e de 26 a 46 anos houve igualdade das prevalências (50%) (Figura 13).

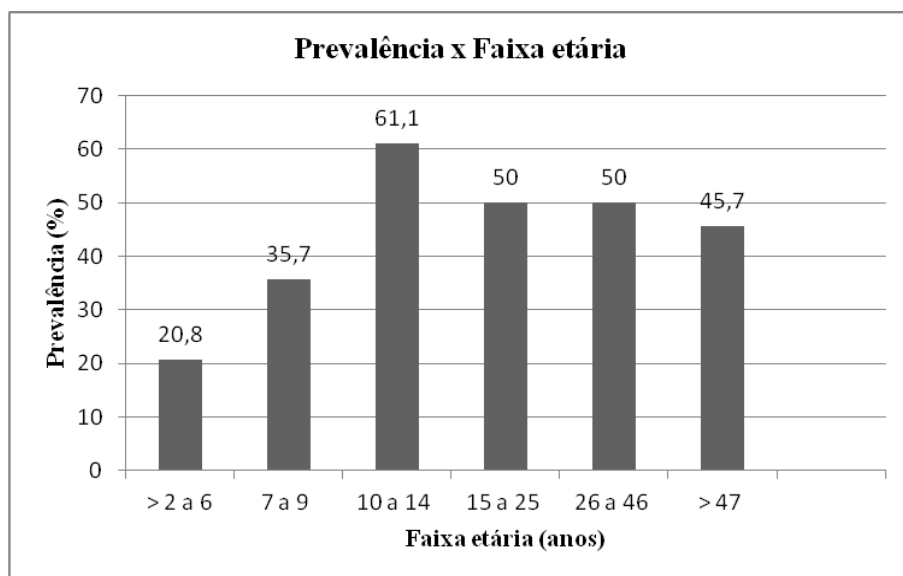


Figura 13: Prevalência da esquistossomose observada em cada faixa etária.

5.2 Avaliação do método Centrífugo-sedimentação (MIFC)

Embora a técnica MIFC tenha sido realizada a partir da mistura de 1-2 gramas de fezes, provenientes de cada uma das três amostras, houve a detecção de apenas 10 indivíduos positivos para infecção por *Schistosoma mansoni* (Tabela 03). Dessa forma, a prevalência indicada pela técnica foi de apenas 4,03% (10/248), ante os 45,91% (118/257) registrada pelo “Padrão Ouro”. A sensibilidade do método foi de 8,54% (IC = 4,71 – 15,02). O valor preditivo negativo observado foi de 55,04% (IC = 48,69 – 61,23), ao passo que o índice Kappa (não ponderado) foi de 0,09 (IC = 0,04 – 0,14).

Tabela 3: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método centrífugo-sedimentação, para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Centrífugo-sedimentação	“Padrão Ouro”		Total (n)
	Positivo (n)	Negativo (n)	
Positivo (n)	10	0	10
Negativo (n)	107	131	238
Total (n)	117	131	248

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.3 Método Gradiente salino

Embora o gradiente salino utilize 500 mg de fezes, a prevalência observada (21,32%) foi inferior à metade da encontrada pelo “Padrão Ouro” (45,91%), identificando 42 positivos em 197 participantes (Tabela 04). Dentre os 94 indivíduos positivos, detectados pelo “Padrão Ouro”, o método foi capaz de identificar somente 42, o que acarretou em uma sensibilidade de 44,68% (IC = 35,04 – 54,74), com valor preditivo negativo de 66,45% (IC = 58,7 – 73,41) e índice Kappa (não ponderado) de 0,458 (IC = 0,340 – 0,575).

Tabela 4: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método gradiente salino, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Gradiente salino	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	42	0	42
Negativo	52	103	155
Total	94	103	197

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

Segundo Melo & Coelho (2011), o uso de métodos quantitativos, tal como gradiente salino, possibilita calcular o número de ovos eliminados por grama de fezes (OPG), o qual pode ser utilizado para se inferir a intensidade da infecção pelo parasito *S. mansoni*.

Seguindo a classificação proposta por WHO (2002), para identificação da carga parasitária contida no hospedeiro, o método gradiente salino diagnosticou 38 indivíduos com infecção leve (OPG 1-99), 02 com infecção moderada (OPG 100-399) e outros 02 com infecção alta (OPG > 399). O menor valor detectado pelo método foi igual a 02 ovos por grama de fezes, ao passo que o maior valor foi igual a 578, com média populacional de 45,76 ovos por grama de fezes (Figura 14).

Tabela 5: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Helmintex®, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Helmintex®	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	87	0	87
Negativo	18	116	134
Total	105	116	221

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.5 Método Teste rápido de urina (POC-CCA)

A análise da amostra urinária de 194 pacientes registrou 89 positivos para a esquistossomose, ou seja, uma prevalência de 45,88% (Tabela 06). Enquanto que a sensibilidade observada foi de 81,65% (IC = 73,35 – 87,1) e o valor preditivo negativo registrado foi de 80,95% (IC = 72,4 – 87,32). Já o índice Kappa (não ponderado) foi de 0,796 (0,658 – 0,934).

Tabela 6: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Teste rápido de urina	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	89	0	89
Negativo	20	85	105
Total	109	85	194

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

Embora a prevalência obtida pelo método Teste rápido urina (POC-CCA) (45,88%) seja igual a observado pelo “Padrão Ouro” (45,91%), o teste rápido diagnosticou 18 indivíduos como positivos, mas que não foram assim classificados por nenhum dos métodos parasitológicos de fezes. Além disso, o método não identificou 38 pacientes diagnosticados como positivo pelo “Padrão Ouro”. Sendo assim, o método foi novamente analisado, mas considerando os 18 indivíduos diagnosticados, apenas no POC-CCA, como negativos. Por tal razão, esta avaliação foi a adota como referência nas comparações feitas pelo presente estudo.

Ao adotar tal medida, o número de indivíduos positivos reduziu para 71 dentre 194 participantes, o que diminuiu a prevalência para 36,60% (Tabela 07). A sensibilidade foi reduzida para 65,14% (IC = 55,81 – 73,43), ao passo que o novo valor preditivo negativo foi de 69,11% (IC = 60,47 – 76,59). Já o índice Kappa (não ponderado) encontrado foi de 0,621 (IC = 0,491 – 0,751).

Tabela 7: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método teste rápido de urina, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Teste rápido de urina	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	71	0	71
Negativo	38	85	123
Total	109	85	194

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.6 Diagnóstico da esquistossomose a partir do método Kato-Katz

5.6.1 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e duas lâminas (AMI K1-K2)

A leitura de duas lâminas, a partir de uma única amostra fecal, é o procedimento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1994). Ao praticar tal

recomendação foi observada uma prevalência de 20,43% (48 positivos em 235 exames realizados) (Tabela 08). Ao comparar esse valor com a prevalência obtida pelo “Padrão Ouro” (45,91%) percebe-se que o modelo de diagnóstico, recomendado pela OMS, subestima a prevalência da doença em 2,2 vezes. Os demais valores estatísticos observados foram de 41,38% (IC = 32,83 – 50,48) para a sensibilidade, de 63,64% (IC = 56,53 – 70,19) para o valor preditivo negativo e de 0,417 (IC = 0,313 – 0,5207) para o índice Kappa (não ponderado).

Tabela 8: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com duas lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

AM1 K1-K2	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	48	0	48
Negativo	68	119	187
Total	116	119	235

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.6.2 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e seis lâminas (AM 1 K1-K6)

A leitura de seis lâminas de uma mesma amostra (AM 1 K1-K6) resultou em uma prevalência de 28,97% (62 positivos em 214 exames realizados) (Tabela 09). A sensibilidade observada foi de 56,36% (IC = 47,04 – 65,26), enquanto o valor preditivo negativo foi de 68,42% (IC = 60,65 – 75,28). O índice Kappa (não ponderado) encontrado foi de 0,557 (0,437 – 0,677).

Tabela 9: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com seis lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

AM 1 K1-K6	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	62	0	62
Negativo	48	104	152
Total	110	104	214

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.6.3 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e doze lâminas (AM 1 K1-K12)

A leitura de 12 lâminas de uma única amostra fecal (AM 1 K1-K12) encontrou uma prevalência de 30,18% (64 positivos/212 indivíduos) (Tabela 10). A sensibilidade observada foi de 58,72% (IC = 49,33 – 67,51), enquanto que o valor preditivo negativo foi de 69,59% (IC = 61,77 – 76,43). O índice Kappa (não ponderado) encontrado foi de 0,580 (IC= 0,458 – 0,702).

Tabela 10: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com doze lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

AM 1 K1-K12	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	64	0	64
Negativo	45	103	148
Total	109	103	212

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.6.4 Avaliação do método Kato-Katz com uma amostra e quatorze lâminas (AM 1 K1-K14)

Ao realizar a leitura de 14 lâminas de uma mesma amostra (AM 1 K1-K14), a prevalência observada foi de 29,91% (64 positivos/214 pacientes) (Tabela 11). Já a sensibilidade e o valor preditivo negativo foram de 58,18% (IC = 48,84 – 66,97) e 69,33% (IC = 61,55 – 76,15), respectivamente. O índice Kappa (não ponderado) encontrado foi de 0,575 (IC = 0,454 – 0,697).

Tabela 11: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com quatorze lâminas de uma mesma amostra, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

AM 1 K1-K14	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	64	0	64
Negativo	46	104	150
Total	110	104	214

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.6.5 Avaliação do método Kato-Katz com três amostras e seis lâminas (AM 1-3 K1-K2)

Ao realizar a leitura de seis lâminas, três amostras com duas lâminas cada (AM 1-3 K1-K2), obteve-se uma prevalência de 37,77% (71 positivos/188 indivíduos) (Tabela 12). A sensibilidade observada foi de 65,74% (IC = 56,39 – 74,01%), enquanto que o valor preditivo negativo e o índice Kappa (não ponderado) foram de 68,38% (IC = 59,48 – 76,1) e 0,62 (0,488 – 0,752), respectivamente.

Tabela 12: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pelo método Kato-Katz, com duas lâminas, provenientes de três amostras cada, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

AM 1-3 K1-K2	“Padrão Ouro”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	71	0	71
Negativo	37	80	117
Total	108	80	188

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.7 Efeito do aumento do número de lâminas do método Kato-Katz para uma mesma amostra

A prevalência e a sensibilidade, obtidas a partir de uma amostra com 6, 12 e 14 lâminas e de três amostras com duas lâminas cada, foram comparadas (Figura 15).

Efeito do aumento do número de lâminas e amostras

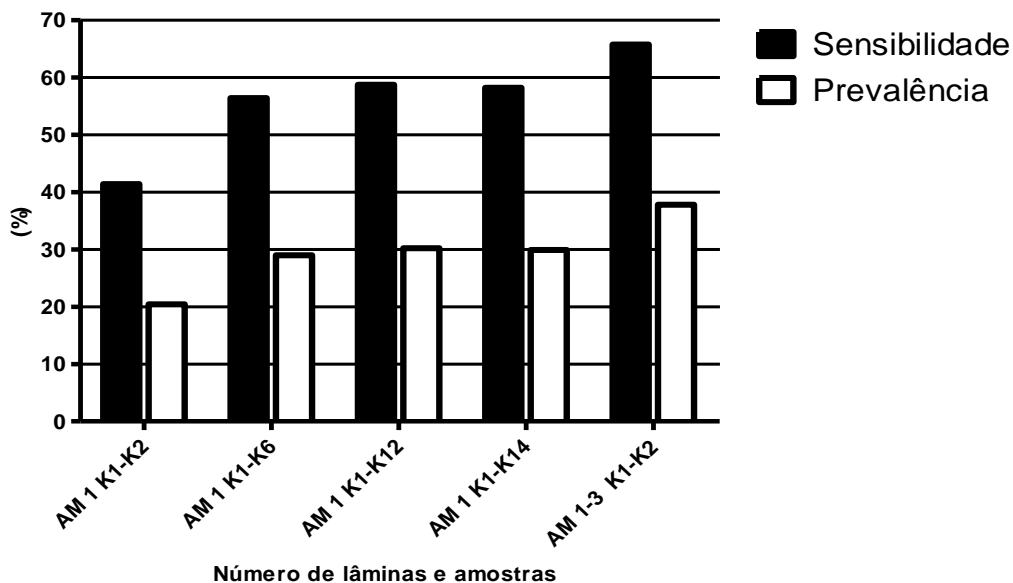


Figura 15: Efeito do aumento do número de lâminas e amostras analisadas pelo método Kato-Katz, em relação à sensibilidade e a prevalência da esquistossomose.

5.8 Determinação do número de ovos por grama de fezes

A intensidade da infecção por *S. mansoni* foi estimada a partir da média do número de ovos eliminados por grama de fezes, obtida com base na leitura de duas lâminas de uma mesma amostra. Com tal metodologia, e de acordo com a classificação de WHO, 2002, foram diagnosticados 32 indivíduos com carga parasitária leve (1-99 OPG), 12 com carga moderada (100-399 OPG) e 4 com carga parasitária alta (> 399 OPG) (Figura 16). Os valores de OPG encontrados variaram de 12 a 4212, com uma média populacional de 210 ovos por grama de fezes, ou seja, uma infecção moderada na área pesquisada. Entretanto, observou-se que essa elevada média de OPG sofreu forte influência da quantidade de ovos eliminados nas fezes de dois pacientes (Indivíduo A = 1716 OPG; Indivíduo B = 4212 OPG). Isso foi confirmado ao desconsiderar o resultado desses dois indivíduos, o que nos permitiu encontrar uma média de 90,26 OPG, ou seja, uma infecção leve.

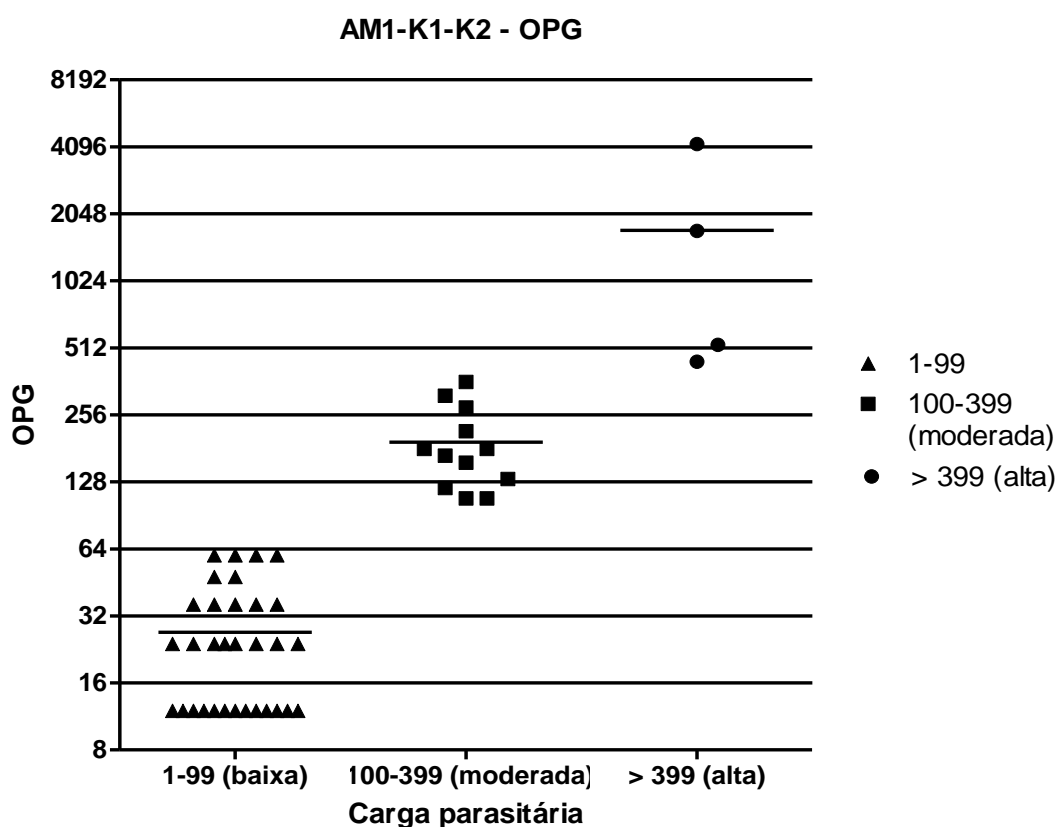


Figura 16: Distribuição e classificação dos indivíduos positivos com base no número de ovos eliminados por grama de fezes (OPG), segundo o método Kato-Katz com duas lâminas de uma única amostra. Classificação em carga parasitária leve (OPG 1-99; n=32), moderada (OPG 100-399; n=12), e alta (OPG > 399; n=4) de acordo com a OMS (2002).

Ao detalhar os indivíduos com carga parasitária leve, notou-se que 13 indivíduos possuíam o OPG mínimo para detecção por duas lâminas de Kato-Katz (12), 08 apresentaram 24 OPG, 05 com 36 OPG, 02 com 48 OPG e 04 com 60 OPG (Figura 17).

Detalhamento da distribuição de indivíduos com baixa carga parasitária

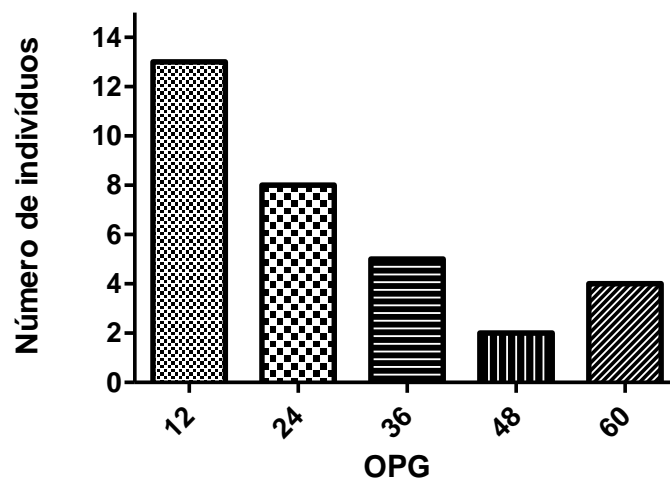


Figura 17: Distribuição do número de indivíduos com baixa carga parasitária.

A média de ovos na população, a partir da análise de 12 lâminas de Kato-Katz, foi igual a 75 OPG. Dentre os indivíduos examinados, 54 apresentaram baixa carga parasitária, 06 tiveram uma carga parasitária média e 04 foram diagnosticados com alta carga (Figura 18). Os valores mínimo e máximo foram de 02 e 2988, respectivamente.

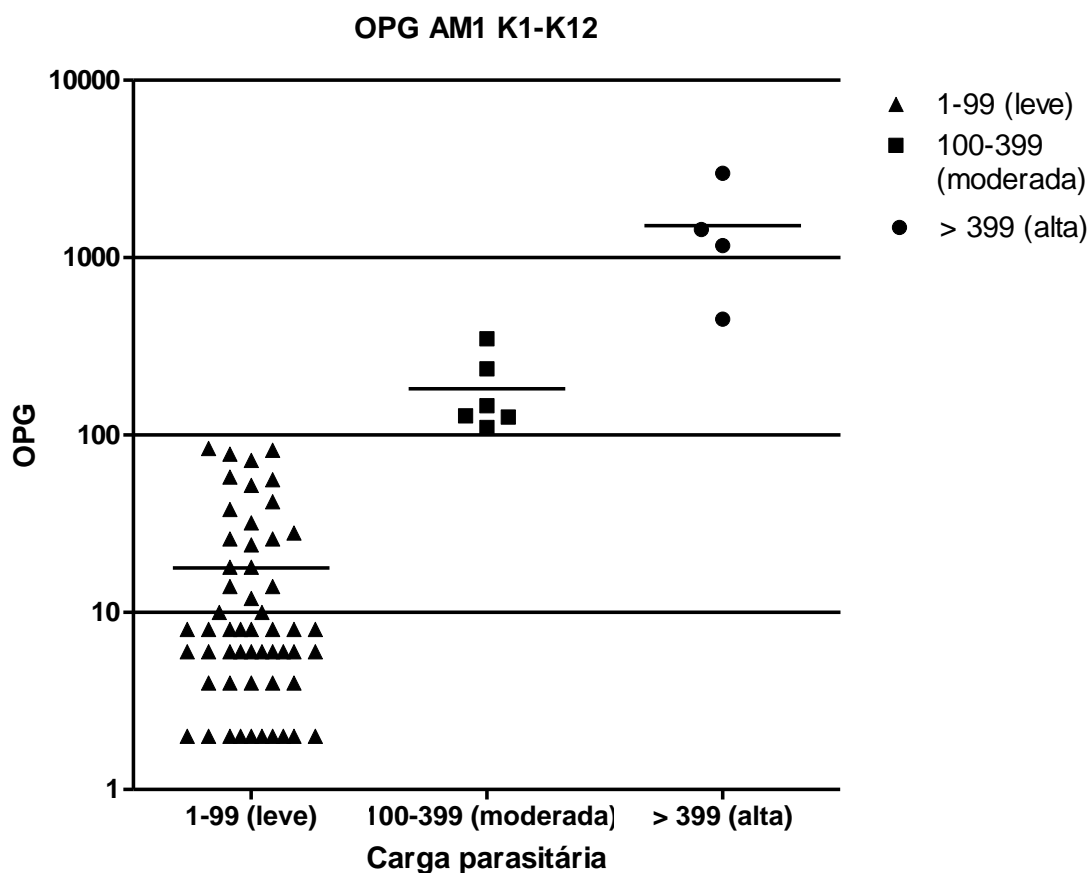


Figura 18: Distribuição e classificação dos indivíduos positivos com base no número de ovos eliminados por grama de fezes (OPG), segundo o método Kato-Katz com doze lâminas de uma única amostra. Classificação em carga parasitária leve (OPG 1-99; n=32), moderada (OPG 100-399; n=12), e alta (OPG > 399; n=4) de acordo com a OMS (2002).

5.9 – Avaliação do desempenho de cada método em função da carga parasitária encontrada pelo AM1 K1-K2

Para se avaliar o desempenho de cada método em função da carga parasitária foi utilizado o método Kato-Katz com duas lâminas (AM1 K1-K2). Os indivíduos diagnosticados como positivo pelo “Padrão Ouro”, mas com OPG igual à zero no AM1 K1-K2, foram classificados como baixa carga parasitária. Essa adaptação da classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) foi necessária, visto que a carga parasitária desses indivíduos, possivelmente, estava abaixo do limiar de detecção pelo AM1 K1-K2, ou seja, inferior a 12 OPG. Os resultados obtidos foram sintetizados e comparados entre si (Tabela 13).

Tabela 13: Avaliação do desempenho de diferentes métodos de diagnóstico em função da carga parasitária encontrada a partir da leitura de duas lâminas de Kato-Katz (AM1 K1-K2). Observação: AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz e; POC-CCA: Teste rápido de urina.

Método	Carga Parasitária em função do OPG		
	Baixa (0* - 99)	Média (100 - 399)	Alta (> 399)
Centrífugo-Sedimentação	5% (05/100)	27,27% (03/11)	50% (02/04)
AM1 K1-K2	32% (32/100)	100% (12/12)	100% (04/04)
AM1 K1-K6	48,94% (46/94)	100% (12/12)	100% (04/04)
AM1 K1-K12	52,13% (49/94)	100% (11/11)	100% (04/04)
AM1 K1-K14	52,13% (49/94)	100% (11/11)	100% (04/04)
AM1-3 K1-K2	59,78% (55/92)	100% (12/12)	100% (04/04)
Gradiente Salino	39,02% (32/82)	100% (06/06)	100% (04/04)
Helmintex®	82,22% (74/90)	100% (11/11)	100% (03/03)
POC-CCA	60% (57/95)	100% (09/09)	100% (04/04)
Padrão Ouro	100% (100/100)	100% (12/12)	100% (04/04)

* Indivíduos diagnosticados como positivo pelo “Padrão Ouro”, mas com OPG igual à zero no AM1 K1-K2, foram classificados como tendo baixa carga parasitária.

5.10 – Síntese e comparação dos valores observados com os diferentes métodos

O método Centrífugo-sedimentação ou MIFC foi o que subestimou, de modo mais intenso, a prevalência da esquistossomose. A técnica de Kato-Katz apresentou uma maior sensibilidade ao aumentar o número de amostras ou lâminas lidas. O uso de 500 mg de fezes pelo método Gradiente salino identificou uma prevalência inferior à observada com a mesma quantidade de fezes, por meio do Kato-Katz (AM 1 K1-K12). A técnica Helmintex® foi a que apresentou a maior concordância diagnóstica com o “Padrão Ouro”. O teste rápido de urina

(POC-CCA) foi capaz de detectar uma prevalência superior à observada pelo AM 1 K1-K2, mas comparável à AM 1-3 K1-K2 (Tabela 14).

Tabela 14: Síntese e comparação dos valores estatísticos obtidos a partir da análise dos resultados encontrados com os diferentes métodos diagnósticos, tendo como referência o número de indivíduos positivos confirmados pelo “Padrão Ouro”.

Método	Prevalência (%)	Sensibilidade (%)	VPN (%)	Kappa
MIFC	4,03	8,54 (4,71 – 15,02)	55,04 (48,69 – 61,23)	0,09 (0,04 – 0,14)
AM 1 K1-K2	20,43	41,38 (32,83 – 50,48)	63,64 (56,53 – 70,19)	0,417 (0,313 – 0,521)
AM 1 K1-K6	28,97	56,36 (47,04 – 65,26)	68,42 (60,65 – 75,28)	0,557 (0,437 – 0,677)
AM 1 K1-K12	30,18	58,72 (49,33 – 67,51)	69,59 (61,77 – 76,43)	0,580 (0,458 – 0,702)
AM 1 K1-K14	29,91	58,18 (48,84 – 66,97)	69,33 (61,55 – 76,15)	0,575 (0,454 – 0,697)
AM 1-3 K1-K2	37,77	65,74 (56,39 – 74,01)	68,38 (59,48 – 76,1)	0,62 (0,488 – 0,752)
Gradiente salino	21,32	44,68 (35,04 – 54,74)	66,45 (58,7 – 73,41)	0,458 (0,340 – 0,575)
Helmintex®	39,37	82,86 (74,52 – 88,87)	86,57 (79,76 – 91,33)	0,835 (0,705 – 0,965)
POC-CCA	36,30	65,14 (55,81 – 73,43)	69,11 (60,47 – 76,59)	0,621 (0,491 – 0,751)

Observação: MIFC: Centrífugo-sedimentação; AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz; POC-CCA: Teste rápido de urina; VPN: Valor Preditivo Negativo.

5.11 Comparações entre dois métodos

A quantidade de material fecal, em muitos casos, não foi suficiente para a realização de todos os métodos parasitológicos. Sendo assim, a contagem dos indivíduos identificados pelas diferentes combinações seguiu ao seguinte procedimento (Tabela 15):

Tabela 15: Procedimento adotado diante de cada situação, ao longo do processo de contabilização do diagnóstico de cada indivíduo.

Situação	Contabilizada como
I. Ambos os métodos identificaram o indivíduo como positivo.	Positivo
II. Um dos métodos identificou como positivo e o outro como negativo.	Positivo
III. Um dos métodos identificou como positivo, e o outro não foi realizado.	Não realizado
IV. Ambos os métodos identificaram como negativo.	Negativo
V. Um método identificou como negativo e outro não foi realizado.	Não realizado
VI. Ambos os métodos não foram realizados.	Não realizado

Em relação à situação V, a contabilização deve ser considerada como não realizada, pois embora o primeiro método tenha resultado negativo, pode ocorrer de ao realizar o segundo método, este detectar a infecção. Portanto, foi prudente não contabilizar os indivíduos que tenham apresentado o seu diagnóstico em tal situação.

5.11.1 Comparação entre o método parasitológico Helmintex® em relação aos demais métodos utilizados no diagnóstico da esquistossomose mansoni

5.11.1.1 Comparação Helmintex® e Gradiente salino

Ao utilizar tal combinação foram identificados 74 positivos em 182 pacientes, o que resultou em uma prevalência de 46,80%. Sendo que 34 positivos foram identificados por ambos os métodos, 37 apenas pelo Helmintex® e 03 somente pelo gradiente salino (Tabela 16). A taxa de positividade do Helmintex® (39,01%) foi significativamente maior ($p < 0,0000001$) do que a encontrada pelo gradiente salino (20,33%). O gradiente salino, em relação ao Helmintex®, apresentou sensibilidade de 47,89% (IC = 36,38 – 59,31), especificidade de 97,3% (IC = 92,35 – 99,08), VPP de 91,89% (IC = 78,7 – 97,2), VPN de 74,48% (IC = 66,82 – 80,88) e índice Kappa (não ponderado) de 0,495 (IC = 0,363 – 0,626).

Tabela 16: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e gradiente salino, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Gradiente salino	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	34	03	37 (20,33%)
Negativo	37	108	145
Total	71 (39,01%)	111	182

Observação: $p < 0,0001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.1.2 Comparação Helmintex® e Centrífugo-sedimentação (MIFC)

A combinação entre os dois métodos resultou numa prevalência de 40,28% (87 positivos em 216 indivíduos). O método Helmintex® identificou 87 positivos, incluindo os únicos dez pacientes positivos identificados pelo método Centrífugo-sedimentação. Portanto, somente 10 indivíduos foram diagnosticados por ambos os métodos (Tabela 17). A taxa de positividade do método Helmintex® (40,28%) também foi significativamente maior ($p < 0,0000001$) do que a observada pelo Centrífugo-sedimentação (4,63%). Na comparação do Centrífugo-sedimentação com o Helmintex®, foi observada sensibilidade de 11,49% (IC = 6,36 – 20), especificidade e VPP de 100%, enquanto que o VPN e o índice Kappa (não ponderado) foram de 62,62% (IC = 55,84 – 68,94) e 0,134 (IC = 0,068 – 201), respectivamente.

Tabela 17: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Centrífugo-sedimentação, para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Centrífugo-Sedimentação	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	0	10 (4,63%)
Negativo	77	129	206
Total	87 (40,28%)	129	216

Observação: $p < 0,0000001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.1.3 Comparação entre Helmintex® e Kato-Katz em relação à mesma amostra

A combinação do método Helmintex® com o modelo de diagnóstico, proposto pelo PCE (método Kato-Katz com uma amostra e duas lâminas), encontrou uma prevalência de 45,41% pacientes positivos para a esquistossomose. Observou-se, ainda, uma diferença significativamente maior ($p < 0,0000001$) do Helmintex® em relação ao modelo sugerido pelo PCE, visto que o primeiro obteve uma taxa de positividade de 42,03%, enquanto o segundo alcançou apenas 20,29% (Tabela 18). A sensibilidade de duas lâminas de Kato-Katz em relação ao Helmintex® foi de 40,23% (IC = 30,55 – 50,74) apresentando uma especificidade de 94,17% (IC = 88,45 – 97,15), VPP de 83,33% (IC = 69,4 – 91,68), VPN de 68,48% (IC = 61,04 – 75,08) e um índice Kappa (não ponderado) de 0,37 (IC = 0,25 – 0,49).

Tabela 18: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Kato-Katz (AM 1 K1-K2)	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	35	07	42 (20,29%)
Negativo	52	113	165
Total	87 (42,03%)	120	207

Observação: $p < 0,0000001$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

Entretanto, a prevalência observada pela combinação dos métodos Helmintex® e Kato-Katz com seis lâminas de uma única amostra (AM1 K1-K6) foi de 47,92%. A proporção de indivíduos positivos para *S. mansoni* identificados pelo Helmintex® foi de 43,23%, ao passo que a do Kato-Katz (AM 1 K1-K6) foi de 28,13% (Tabela 19). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,00004$).

A comparação entre os dois métodos revelou que a sensibilidade de seis lâminas de uma mesma amostra em relação ao Helmintex® foi de 55,42% (IC = 44,72 – 65,64), com especificidade de 91,74% (IC = 85,05 – 95,6), VPP de 83,64% (IC = 71,74 – 91,14), VPN de 72,99% (IC = 65,01 – 79,73) e índice Kappa (não ponderado) de 0,491 (IC = 0,357 – 0,626).

Tabela 19: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com seis lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K6), para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Kato-Katz (AM 1 K1-K6)	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	46	09	54 (28,13%)
Negativo	37	100	137
Total	83 (43,23%)	109	192

Observação: $p = 0,00004$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

A prevalência observada pela combinação dos métodos Helmintex® e Kato-Katz com doze lâminas de uma mesma amostra (AM1 K1-K12) foi de 48,95%. A proporção de indivíduos positivos para *S. mansoni* identificados pelo Helmintex® foi de 43,68%, ao passo que a do Kato-Katz (AM 1 K1-K12) foi de 30,53%, o que indica uma diferença significativamente maior ($p = 0,00024$) (Tabela 20). A sensibilidade de uma amostra com doze lâminas, em relação ao Helmintex®, foi de 57,83% (IC = 47,09 – 67,88), com especificidade de 90,65% (IC = 83,65 – 94,84), VPP de 82,76% (IC = 71,09 - 90.36), VPN 73,48% (IC = 65,37 – 80,27) e índice Kappa (não ponderado) de 0,502 (IC = 0,365 – 0,638).

Tabela 20: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com doze lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K12), para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Kato-Katz (AM 1 K1-K12)	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	48	10	58 (30,53%)
Negativo	35	97	149
Total	83 (43,68%)	107	192

Observação: $p = 0,00024$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

No entanto, a combinação dos métodos Helmintex® e Kato-Katz com 14 lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K14) registrou uma prevalência, para a esquistossomose, de 48,69%. Além disso, a taxa de positividade do Helmintex® (43,46%) foi significativamente maior ($p = 0,0002$) do que a observada pela técnica AM 1 K1-K14 (30,37%) (Tabela 21). A leitura de quatorze lâminas de uma mesma amostra apresentou, em relação ao Helmintex®, sensibilidade de 57,83% (IC = 47,09 – 67,88), especificidade de 90,74% (IC = 83,79 – 94,89), VPP de 82,76% (IC = 71,09 – 90,36), VPN = 73,68% (IC = 65,61 – 80,43) e Kappa (não ponderado) de 0,503 (0,367 – 0,634).

Tabela 21: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com quatorze lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K14), para a infecção por *S. mansoni*.

Kato-Katz (AM 1 K1-K14)	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	48	10	58 (30,37%)
Negativo	35	98	133
Total	83 (43,46%)	108	191

Observação: $p = 0,0002$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.1.4 Comparação entre Helmintex® e Kato-Katz (AM 1-3 K1-K2)

A análise, a seguir, refere-se à combinação realizada entre o método Helmintex® e o método Kato-Katz, para o qual se utilizou três amostras com duas lâminas cada, totalizando 6 lâminas e três amostras (AM 1-3 K1-K2). Essa combinação possibilitou registrar uma prevalência de 56,29%, para a esquistossomose. A taxa de positividade do método Helmintex® (47,3%) foi significativamente maior ($p = 0,026$) do que a observada pela combinação de seis lâminas, provenientes de três amostras (AM 1-3 K1-K2) (37,72%) (Tabela 22). A leitura de seis lâminas provenientes de três amostras apresentou, em relação ao Helmintex®, sensibilidade de 60,76% (IC = 49,73 – 70,79), especificidade de 82,95% (IC = 73,76 - 89,39), VPP de 76,19% (IC = 64,36 - 85,01), VPN = 70,19% (IC = 60,81 - 78,14) e Kappa (não ponderado) de 0,442 (0,292 – 0,591).

Tabela 22: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Kato-Katz, com duas lâminas de três amostras cada (AM 1-3 K1-K2), para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Kato-Katz (AM 1-3 K1-K2)	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	48	15	63 (37,72%)
Negativo	31	73	104
Total	79 (47,3%)	88	167

Observação: $p = 0,026$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.1.5 Comparação entre os métodos Helmintex® e Teste rápido de urina (POC-CCA)

A combinação entre o Helmintex® e o Teste rápido de urina (POC-CCA) indicou uma prevalência de 54,44% (92 positivos dentre os 169 indivíduos examinados). Desses 92 indivíduos, 52 foram diagnosticados por ambos os métodos, 28 somente pelo Helmintex® e

12 apenas pelo Teste rápido (Tabela 23). A taxa de positividade do método Helmintex® (47,34%) foi significativamente maior ($p = 0,017$) do que a observada pelo Teste rápido de urina (POC-CCA) (37,87%). A sensibilidade do POC-CCA, em relação ao Helmintex®, foi de 65% (IC = 54.08 - 74.55) apresentando uma especificidade de 86,52% (IC = 77.9 - 92.12), VPP de 81,25% (IC = 70.03 - 88.94), VPN de 73,33% (IC = 64.16 - 80.86) e um índice Kappa (não ponderado) de 0,520 (IC = 0,373 – 0,668).

Tabela 23: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Helmintex® e Teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *Schistosoma mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

POC-CCA	Helmintex®		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	52	12	64 (37,87%)
Negativo	28	77	105
Total	80 (47,34%)	89	169

Observação: $p = 0,017$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.2 Comparação entre o método Kato-Katz com duas lâminas de uma mesma amostra (AM1 K1-K2) em relação às demais metodologias de diagnóstico para a esquistossomose mansoni

5.11.2.1 Comparação AM 1 K1-K2 e Centrífugo-sedimentação

A Combinação do método Kato-Katz com uma amostra e duas lâminas (AM 1 K1-K2) e Centrífugo-sedimentação indicou uma prevalência de 21,12%, para a esquistossomose. A taxa de positividade para AM1 K1-K2 (20,25%) foi significativamente maior ($p < 0,0000001$) do que a observada pelo método centrífugo-sedimentação (4,31%). O uso de uma amostra com duas lâminas diagnosticou 47 pacientes com esquistossomose, destes 39 não foram identificados pelo centrífugo-sedimentação. O centrífugo-sedimentação identificou 10

pacientes, dos quais apenas 02 não foram detectados pelo Kato-Katz (AM 1 K1-K2). No total, somente 08 positivos foram identificados por ambos os métodos (Tabela 24).

Em relação a duas lâminas de Kato-Katz da mesma amostra, a sensibilidade do centrífugo-sedimentação foi de 17,02% (IC= 8,89 – 30,14) apresentando uma especificidade de 98,92% (IC = 96,14 – 99,7), VPP de 80% (49,02 – 94,33), VPN de 82,43% (IC = 76,89 – 86,87) e índice Kappa (não ponderado) de 0,226 (IC = 0,134 – 0,318).

Tabela 24: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), e Centrífugo-sedimentação, para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Centrífugo-sedimentação	Kato-Katz (AM 1 K1-K2)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	08	02	10 (4,31%)
Negativo	39	183	222
Total	47 (20,25%)	185	232

Observação: $p < 0,0000001$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.2.2 Comparação entre o método Kato-Katz (AM 1 K1-K2) e Gradiente salino

A prevalência observada para a combinação entre o AM 1 K1-K2 e o gradiente salino foi de 27,75%. O primeiro método identificou 35 pacientes, dos quais 13 não foram diagnosticados pelo gradiente salino. O segundo, por sua vez, diagnosticou 40 pacientes. Contudo, 18 indivíduos não foram detectados pelo AM 1 K1-K2. O número de pacientes diagnosticados por ambos os métodos foi de 22. A taxa de positividade para o AM 1 K1-K2 foi de 18,32%, enquanto que o gradiente salino registrou 20,94% (Tabela 25). Essa diferença não foi significativa ($p = 0,473$). Em relação a duas lâminas de Kato-Katz da mesma amostra, a sensibilidade do gradiente salino foi de 62,86% (IC= 46,34 – 76,83) apresentando uma

especificidade de 88,46% (IC = 82,5 – 92,58), VPP de 55% (39,83 – 69,29), VPN de 91,39% (IC = 85,83 – 94,9) e índice Kappa (não ponderado) de 0,486 (IC = 0,345 – 0,628).

Tabela 25: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), e gradiente salino, para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

Gradiente salino	Kato-Katz (AM 1 K1-K2)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	22	18	40 (20,94%)
Negativo	13	138	151
Total	35 (18,32%)	156	191

Observação: $p = 0,473$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.2.3 Comparação entre Kato-Katz (AM 1 K1-K2) e Teste rápido de urina (POC-CCA) no diagnóstico da esquistossomose mansoni

Ambos os métodos foram capazes de identificar 37 pacientes positivos, para a esquistossomose. Seis positivos foram diagnosticados apenas pelo AM 1 K1-K2, enquanto outros 33 somente foram detectados pelo POC-CCA (Tabela 26). A prevalência observada, para tal combinação, foi de 42%. A taxa de positividade apresentada pelo AM 1 K1-K2 (23,76%) foi significativamente menor ($p < 0,00001$) do que a registrada pelo Teste rápido de urina (38,67%).

A leitura do teste rápido de urina apresentou, em relação ao Kato-Katz, sensibilidade de 86,05% (IC = 72,74 – 93,44), especificidade de 76,09% (IC = 68,33 – 82,44), VPP de 52,86% (IC = 41,32 – 64,1), VPN = 94,59% (IC = 88,71 – 97,5) e Kappa (não ponderado) de 0,511 (0,374 – 0,648).

Tabela 26: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K2), e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

POC-CCA	Kato-Katz (AM 1 K1-K2)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	37	33	70 (38,67%)
Negativo	06	105	111
Total	43 (23,76%)	138	181

Observação: $p < 0,00001$, obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.2.4 Comparação entre os métodos AM 1 K1-K6 e Teste rápido de Urina (POC-CCA)

A combinação dos métodos AM 1 K1-K6 e Teste rápido de urina detectaram uma prevalência de 45,83% (77 positivos em 168 pacientes). Desses, 45 foram diagnosticados por ambos os métodos, ao passo que somente 12 foram detectados pelo Kato-Katz e 20 apenas com o POC-CCA (Tabela 27). A taxa de positividade do AM 1 K1-K6 foi de 33,93%, enquanto a do teste rápido foi de 38,7%, o que não representa uma diferença significativa ($p = 0,215$). Os dados estatísticos do teste rápido, em relação a essa variação do Kato-Katz, foram: sensibilidade de 78,95% (IC = 66,71 – 87,53); Especificidade de 82% (IC = 73,8 – 88,02), VPP e VPN de 69,23% (IC = 57,2 – 79,11) e 88,35% (IC = 80,73 – 93,21%), respectivamente e; índice Kappa (não-ponderado) de 0,59 (0,44 – 0,74).

Tabela 27: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com seis lâminas de uma única amostra (AM 1 K1-K6), e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

POC-CCA	Kato-Katz (AM 1 K1-K6)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	45	20	65 (38,7%)
Negativo	12	91	103
Total	57 (33,93%)	111	168

Observação: $p = 0,215$ obtido pelo teste do Qui-Quadrado.

5.11.2.5 Comparação entre os métodos AM 1-3 K1-K2 e POC-CCA

A combinação dos métodos AM 1-3 K1-K2 e POC-CCA detectaram uma prevalência de 52,7% (79 positivos em 150 pacientes). Desses, 51 foram diagnosticados por ambos os métodos, 15 somente pelo Kato-Katz e 13 apenas com o teste rápido de urina. A taxa de positividade do AM 1-3 K1-K2 foi de 44%, enquanto a do POC-CCA foi de 42,7%, o que não representa uma diferença significativa ($p = 0,851$) (Tabela 28). Os dados estatísticos do POC-CCA, em relação a essa variação do Kato-Katz, foram: sensibilidade de 77,27% (IC = 65,83 – 85,71); Especificidade de 84,52% (IC = 75,3 – 90,73), VPP e VPN de 76,7% (IC = 68,29 – 87,73) e 82,56% (IC = 73,2 – 89,14%), respectivamente e; índice Kappa (não-ponderado) de 0,62 (0,46 – 0,78).

Tabela 28: Distribuição dos resultados diagnósticos realizados pela combinação entre os métodos Kato-Katz, com duas lâminas provenientes de três amostras cada (AM 1-3 K1-K2), e teste rápido de urina (POC-CCA), para a infecção por *S. mansoni*. Os valores indicam os números de indivíduos negativos e positivos e o número total para cada teste em comparação com o “Padrão Ouro”.

POC-CCA	Kato-Katz (AM 1-3 K1-K2)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	51	13	64 (42,7%)
Negativo	15	71	86
Total	66 (44%)	84	150

Observação: O valor $p = 0,851$ foi obtido a partir do teste do Qui-quadrado.

5.12 Avaliação da prevalência e taxa de positividade apresentada por cada combinação

O cálculo da prevalência, detectada pela combinação entre dois métodos, foi realizado a partir do número de indivíduos positivos identificados pela combinação, dividido pelo número de exames realizados pela combinação. Em contrapartida, o cálculo da taxa de positividade foi determinado com base no número de positivos encontrados pela combinação, dividido pelo total de positivos detectados pelo “Padrão Ouro”.

Dentre as diferentes combinações realizadas com o método Helmintex®, observou-se que o método MIFC foi o que apresentou a menor prevalência (40,28%) e menor taxa de positividade (82,86%). Por outro lado, as combinações do Helmintex® com o AM 1-3 K1-K2 ou com o POC-CCA revelaram, de modo semelhante, as maiores prevalências (56,29% e 54,44%) e taxas de positividade (97,92% e 93,88%), respectivamente (Tabela 29). Entretanto, o aumento do número de lâminas lidas através da técnica Kato-Katz não se mostrou relevante, quando combinado com o Helmintex®.

Tabela 29: Prevalência e Taxa de positividade da esquistossomose detectada a partir da combinação entre o método Helmintex® e as demais técnicas, em relação aos indivíduos positivos diagnosticados pelo Padrão Ouro (soma dos diagnósticos parasitológicos).

Método Helmintex®	MIFC	GRAD	AM1 K1-K2	AM1 K1-K6	AM1 K1-K12	AM1 K1-K14	AM1-3 K1-K2	POC- CCA
Prevalência	40,28%	46,80%	46,95%	47,92%	48,95%	48,69%	56,29%	54,44%
Tx Positiv.*	82,86%	88,79%	90,91%	92,93%	93,94%	93,94%	97,92%	93,88%

Observação: *Taxa de positividade; MIFC: Centrífugo-sedimentação; GRAD: Gradiente salino; AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz; POC-CCA: Teste rápido de urina.

Ao realizar diferentes combinações, tendo o Kato-Katz como método de referência, notou-se que para duas lâminas a combinação com o MIFC foi a que apresentou a menor prevalência (21,12%) e menor taxa de positividade (42,61%). A combinação do Kato-Katz com o POC-CCA apresentou melhores resultados ao elevar o número de lâminas e de amostras (Tabela 30).

Tabela 30: Prevalência e Taxa de positividade da esquistossomose detectada a partir da combinação entre o método Kato-Katz e as demais técnicas, em relação aos indivíduos positivos diagnosticados pelo Padrão Ouro (soma dos diagnósticos parasitológicos).

Método K-K	AM1 K1-K2 +	AM1 K1-K2 +	AM1 K1-K2 +	AM1 K1-K2 +	AM1 K1-K6 +	AM1-3 K1-K2 +
	MIFC	GRAD	HTX	POC-CCA	POC-CCA	POC-CCA
Prev.*	21,12%	27,75%	48,95%	42%	45,83%	52,70%
Posit.**	42,61%	57,61%	93,94%	70,37%	75,49%	79%

Observação: *Prevalência; **Taxa de positividade; MIFC: Centrífugo-sedimentação; GRAD: Gradiente salino; HTX: Helmintex®; AM 1 K1-K2, AM 1 K1-K6, AM 1 K1-K12, AM 1 K1-K14: Uma amostra fecal com duas, seis, doze e quatorze lâminas de Kato-Katz, respectivamente; AM 1-3 K1-K2: Três amostras fecais, sendo que cada amostra originou duas lâminas de Kato-Katz; POC-CCA: Teste rápido de urina.

6 DISCUSSÃO

Nas localidades endêmicas para a esquistossomose, a fase da doença de maior predomínio é a fase crônica, a qual é ocasionada pelas constantes exposições a coleções d'água contaminadas com cercárias. Nessas situações, a primo-infecção frequentemente ocorre em torno dos dois anos de idade, sendo que a maior prevalência e intensidade de infecção tendem a ocorrer em jovens e adolescentes, as quais geralmente diminuem na idade adulta (Conceição & Coura, 1978; Coura-Filho *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 2006; Colley *et al.*, 2014).

A análise do perfil epidemiológico, do presente estudo, apontou dados condizentes com os referidos por Fleming *et al.* (2006) e Colley *et al.* (2014). A menor prevalência (20,83%) foi observada na faixa etária dos 2 aos 6 anos, aumentando para 35,7% dos 7 aos 9 anos e atingindo o seu valor máximo (61,1%) dos 10 aos 14 anos. A partir da faixa etária de 15 a 25 anos, a qual inclui o início da vida adulta, houve uma redução da prevalência (50%), que se estabilizou dos 26 aos 46 anos, sofrendo uma nova redução (45,70%) após os 46 anos.

A elevação da prevalência até a segunda década de vida também já havia sido observada em diversas outras áreas endêmicas descritas na literatura (Conceição & Coura, 1978; Fleming *et al.*, 2006), o que pode ser devido tanto à intensidade e ao tipo de contato com águas naturais estabelecidos pelos diversos grupos etários quanto à imunidade adquirida com o aumento da idade dos indivíduos expostos (Katz *et al.*, 1978). Em estudo realizado com lavadores de carro, foi observado que a resistência à reinfecção por *S. mansoni* pode ser adquirida ou aumentada por adultos após várias rodadas de reinfecção e cura (Black *et al.*, 2010). Contudo, os autores desse estudo ressaltam que a taxa em que a resistência é adquirida por este meio depende do estado imunológico e da história de exposição às infecções por *S. mansoni*.

Ao analisar a proporção de indivíduos positivos, de acordo com o sexo, observou-se que 45,08% dos homens estavam positivos para *Schistosoma mansoni*, enquanto que 46,7% das mulheres foram positivas, o que indica não haver diferença ($p = 0,793$) entre a proporção de homens e mulheres infectados. Esses dados, portanto, contradizem os encontrados por Coura-Filho *et al.* (1995), no município de Ravena, Minas Gerais, o qual observou uma maior prevalência no sexo feminino.

A semelhança entre as proporções de positivos dos dois sexos talvez possa ser explicada pelo fato de ambos serem igualmente expostos ao risco de infecção, visto que no riacho, situado na localidade do Brejo do Amparo, os moradores se banham, lavam roupas e

animais de pequeno ou grande porte, pescam, nadam, retiram água para o consumo residencial, dentre outras atividades.

Segundo relatos de moradores e funcionários do serviço de saúde local, o Programa de Controle da Esquistossomose, com o objetivo de controle e erradicação da esquistossomose, tem realizado a identificação e tratamento dos indivíduos positivos. Contudo, é sabido que o diagnóstico rápido e preciso da infecção por *S. mansoni* é o principal fator para um controle eficaz da esquistossomose (Zhao *et al.*, 2012), uma vez que as ações de monitoramento da morbidade, expansão de áreas endêmicas, avaliação de cura ou reinfeção pós-tratamento são baseadas nos resultados apontados pelos métodos de diagnóstico aplicados na população em estudo (Utzinger, 2001). No entanto, as constantes ações promovidas pelos programas de controle da esquistossomose, dentre elas o tratamento quimioterápico em massa, têm contribuído para um aumento das áreas de baixa endemicidade e do número de pacientes com baixa carga parasitária, os quais são difíceis de serem diagnosticados (Grenfell *et al.*, 2014).

O diagnóstico da esquistossomose mansoni é predominantemente realizado por meio da utilização de métodos parasitológicos, os quais permitem a visualização microscópica de ovos eliminados junto às fezes do hospedeiro.

O primeiro método parasitológico avaliado pelo presente estudo foi o Centrífugo-Sedimentação (MIFC). Esse método tem por finalidade concentrar as formas parasitárias presentes nas amostras fecais dos pacientes. O MIFC tem sido frequentemente utilizado na rotina laboratorial, visto que, assim como a sedimentação espontânea, é um método barato, de fácil execução e que ainda permite a pesquisa de várias formas evolutivas dos parasitas intestinais do homem (Rocha & Mello, 2011). Contudo, esse método foi o que se mostrou menos eficiente no diagnóstico da esquistossomose, uma vez que apresentou uma baixa sensibilidade quando comparada com o “Padrão Ouro”. Portanto, embora esse seja um método barato e de fácil realização, o presente estudo não recomenda a sua utilização para a detecção da esquistossomose.

Desde o ano de 1994, a leitura de duas lâminas pelo método desenvolvido por Kato (Kato & Miura, 1954) e modificado por Katz *et al.* (1972) é recomendado pela Organização Mundial de Saúde como o método de escolha para o diagnóstico da doença (WHO, 1994). Os argumentos utilizados para recomendar a técnica de Kato-Katz são de que ele seria o melhor método quantitativo disponível, devido ao seu baixo custo, facilidade de aprendizagem, baixa quantidade de materiais especiais para sua execução e não utilização de produtos perigosos (Ebrahim *et al.* 1997). Entretanto, a consistência das fezes pode interferir no diagnóstico da

doença, visto que fezes aquosas não podem ser processadas e fezes muito secas ou fibrosas dificultam a visualização dos ovos do helminto (Feldmeier & Poggensee, 1993). Dessa forma, a utilização de tal técnica, como único método de diagnóstico para a esquistossomose, tende a subestimar a prevalência da doença. Além disso, a subestimativa também pode ser ocasionada devido à dificuldade em detectar indivíduos com baixa carga parasitária (Engels *et al.*, 1996; Noya *et al.*, 2006), ou com infecção crônica (Warren, 1978) ou que foram recentemente submetidos a tratamento quimioterápico (Lamberton *et al.*, 2014), uma vez que todas ocasionam diminuição e intermitência da eliminação de ovos nas fezes.

O presente estudo também observou que o método diagnóstico Kato-Katz, com duas lâminas de uma mesma amostra, subestima a prevalência da esquistossomose em casos de baixa carga parasitária. Isso porque o “Padrão Ouro” detectou uma prevalência de 45,91%, ao passo que o Kato-Katz (AM 1 K1-K2) registrou a prevalência de apenas 20,43%, ou seja, esta técnica subestimou a prevalência da doença em 2,2 vezes. A leve infecção por *S. mansoni* (90 OPG), apresentada pela população em estudo, associada à baixa sensibilidade do método (41,38%) foram apontadas como possíveis explicações para a subestimativa apresentada por essa técnica. Portanto, a não detecção de ovos de *S. mansoni*, na análise de poucas lâminas ou amostras, não é suficiente para se confirmar a ausência da infecção, visto que há a possibilidade de resultados falso-negativos.

A fim de se obter uma maior capacidade de detecção de infecções leves por *S. mansoni*, por meio do método Kato-Katz, Enk *et al.* (2008) realizou um estudo em Chonim de Cima, Governador Valadares, MG, no qual se aumentou o número de amostras e lâminas lidas. Na ocasião, a leitura de duas e seis lâminas de uma mesma amostra encontrou uma prevalência de 15,4% e de 19,0%, respectivamente. Além disso, ao realizar o exame de três amostras, com duas lâminas cada, a prevalência aumentou para 25,9%.

Ao realizar tal procedimento, o presente estudo, observou fato semelhante ao encontrado por Enk *et al.* (2008). Para uma mesma amostra, a leitura de duas lâminas (AM 1 K1-K2) registrou uma prevalência de 20,43%, enquanto que as demais prevalências foram de 28,97% com seis lâminas (AM 1 K1-K6), 30,18% com doze lâminas (AM 1 K1-K12) e 29,91% com quatorze lâminas (AM 1 K1-K14). Ao examinar três amostras com duas lâminas cada (AM 1-3 K1-K2) foi observada uma prevalência de 37,77%. Esses resultados confirmam que ao se elevar o número de amostras ou de lâminas lidas há um aumento da sensibilidade da técnica (Enk *et al.*, 2008; Adriko *et al.*, 2014). Entretanto, tal aumento deve ser interpretado com ressalva, visto que o aumento da sensibilidade, por meio da variação do número de

lâminas de uma mesma amostra, não foi significativo a partir da leitura de sete lâminas, fato também observado por Da Frota *et al.* (2011). Sendo assim, nossos dados sugerem que a prevalência obtida com a leitura de um número superior a seis lâminas (aproximadamente 250 mg de fezes) de uma mesma amostra não justifica o esforço laboratorial. Um novo aumento da sensibilidade da técnica pode ser alcançado por meio do aumento do número de amostras lidas, o qual apresentou uma sensibilidade significativamente maior tanto em relação ao uso de duas, quanto seis lâminas de uma mesma amostra.

Portanto, o nosso estudo corrobora com outros autores, no sentido de que o grau de detecção do método Kato-Katz depende do número de amostras processadas e lâminas lidas, bem como da prevalência e intensidade da infecção presente na população (De Vlas and Gryseels, 1992).

No entanto, tal conduta na prática médica ou em atividades de campo não é de fácil aplicação, pois, como observado no presente trabalho e também mencionado por Enk *et al.* (2008), muitos pacientes não coletam as três amostras quer seja por dificuldade em evacuar, constrangimento ou apenas por mero esquecimento.

Diante do exposto, diversos autores têm sugerido o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de novos métodos parasitológicos com maior sensibilidade e especificidade em áreas de baixa endemicidade e em pacientes com baixa carga parasitária (Teixeira *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2009). Como forma de avaliação dos novos métodos, estudos parasitológicos vêm sendo realizados tanto com as novas técnicas, quanto com a técnica Kato-Katz, e os resultados obtidos por cada método têm sido comparados entre si.

Como possível alternativa para o diagnóstico da esquistossomose, foi elaborado, no final da última década, o método parasitológico Gradiente salino (Coelho *et al.*, 2009). A técnica consiste na purificação de 500 mg de fezes, por meio de um fluxo lento e contínuo de solução salina 3%. Devido aos constantes aprimoramentos da técnica, atualmente o método tem sido considerado de baixo custo e de considerável praticidade em estudos de campo, visto que cada equipamento pode realizar a purificação de até 6g de fezes (12 amostras x 500mg de fezes) em um intervalo de 60 minutos. Como cada 500mg equivale a 12 lâminas de Kato-Katz e a versão mais moderna do equipamento (aranha) possui a capacidade de processar até 12 amostras simultâneas, é possível perceber que o novo método está apto a processar uma quantidade fecal equivalente a 144 lâminas de Kato-Katz (12 lâminas x 12 amostras) por hora. Após o processamento, o tempo gasto para a leitura do conteúdo fecal, realizada por um

examinador de ampla experiência, foi estimado em 20 minutos para cada amostra (Coelho *et al.*, 2009).

Em relação ao Kato-Katz, dados publicados recentemente, mostram que o gradiente salino tem apresentado uma sensibilidade superior. Pinheiro *et al.* (2012), realizou um estudo no município de Maranguape, CE, onde 56 pacientes forneceram material fecal. A proporção de detecções por três lâminas de Kato-Katz foi de 5,36%, enquanto com o gradiente salino foi de 19,64%. Entretanto, no presente estudo, a diferença entre as prevalências identificadas pelas técnicas Kato-Katz (18,32%) e gradiente salino (20,94%) não foi significativa ($p = 0,473$).

Ao comparar a análise da mesma quantidade de fezes, por ambos os métodos, foi observada uma prevalência maior para doze lâminas (500mg) de Kato-Katz (30,18%), em relação ao gradiente salino (21,32%). Contudo, essa diferença não foi significativamente maior ($p = 0,230$). Sendo assim, os nossos dados convergem com os registrados por Coelho *et al.* (2009), o qual observou semelhante proporção de indivíduos positivos para *S. mansoni*, por meio dos métodos gradiente salino e 12 lâminas de Kato-Katz.

Outro método parasitológico desenvolvido, em meados da última década, foi o Helmintex®, no qual trinta gramas de fezes são purificadas por meio dos processos de sedimentação espontânea (método de Hoffman, Pons e Janer), tamisação, centrífugo-sedimentação (método de Ritchie). Em seguida, os ovos são isolados por meio de sua afinidade para esferas paramagnéticas, separados por magneto e submetidos à leitura em microscopia ótica (Teixeira *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por Pinheiro *et al.* (2012), foi observada uma prevalência de 47,1% por meio do método Helmintex®, contra os 8,75% do Kato-Katz e 18% do gradiente salino. As comparações realizadas, pelo presente estudo, também permitiram concluir que o método Helmintex® é o método mais efetivo no diagnóstico da esquistossomose, visto que o Helmintex® identificou uma prevalência de 39,37%, contra os 20,43% de duas lâminas de Kato-Katz e os 21,32% do gradiente salino. Os dados deste projeto, portanto, corroboram com os encontrados por Pinheiro *et al.* (2012), uma vez que o Helmintex® foi o que, dentre os métodos parasitológicos, detectou a maior prevalência.

Ao combinar os métodos Helmintex® e gradiente salino foram identificados 74 positivos em 182 pacientes, o que resultou em uma prevalência de 46,8%. Contudo, a taxa de positividade do Helmintex® (39,01%) foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que a

encontrada pelo gradiente salino (20,33%). Portanto, esses resultados também corroboram com os achados de Pinheiro *et al.* (2012).

Em inquérito epidemiológico, realizado por Caldeira *et al.* (2012), no município de Bandeirinhas - PR foram avaliadas 77 amostras fecais, por meio da combinação Helmintex® e duas lâminas de Kato-Katz. Na ocasião, foi demonstrado que o Helmintex® apresenta uma sensibilidade maior do que duas lâminas de Kato-Katz.

Em nosso estudo, a combinação do método Helmintex® com duas lâminas de Kato-Katz identificou 94 positivos em 207 participantes, sendo que o número de detecções pelo Helmintex® foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que o modelo sugerido pela OMS. Desse modo, os resultados deste trabalho corroboram com os dados publicados por Pinheiro *et al.* (2012) e Caldeira *et al.* (2012).

Apesar do Helmintex® ser o método coproscópico mais sensível, este estudo converge com Caldeira *et al.* (2012) no sentido de que este novo método não deve ser compreendido como um substituto do Kato-Katz, na realização de diagnóstico de rotina para a esquistossomose, mesmo em áreas de transmissão de baixa intensidade. Isso porque a técnica Kato-Katz apresenta simplicidade e baixo custo, ao passo que o Helmintex®, devido à sua laboriosa realização, seria um instrumento final de rastreamento sequencial (avaliação de riscos, análise de KK, sorologia e análise Helmintex®).

O emprego de métodos imunológicos para antígenos circulantes cátodicos (CCA) ou antígenos circulantes anódicos (CAA), provenientes de vermes adultos, detectam infecções atuais e são potencialmente mais sensíveis, do que os parasitológicos, quando utilizados em áreas de baixa transmissão (Cesari *et al.*, 2005; Grenfell *et al.*, 2014). Os antígenos catódicos circulantes (CCA) são regurgitados pelo parasito e, embora presente no soro, é melhor detectado na urina. A concentração de CCA é acentuadamente reduzida em, aproximadamente, uma semana após o uso de quimioterápicos (Van't Wout *et al.*, 1992; Van Lieshout *et al.* 1993), o que permite a detecção apenas dos indivíduos com infecção ativa. A análise de conteúdos urinários, submetidos ao teste rápido de urina (POC-CCA), dotado de anticorpos monoclonais, têm registrado uma satisfatória captura do antígeno tanto em pacientes com infecções alta e moderada, quanto de leve intensidade (Adriko *et al.*, 2014). Além disso, o método é de fácil leitura e execução, o que permite a sua realização por diferentes profissionais de saúde e em unidades básicas de saúde ou atividades de campo. A estimativa de custo para cada teste foi de 2,50 dólares ou 7,00 reais, já inclusas as taxas de importação.

No presente estudo, a prevalência obtida pelo método Teste rápido urina (POC-CCA) (45,88%) foi igual à encontrada com o “Padrão Ouro” (45,91%). Contudo, ao comparar os resultados, de modo individualizado, notou-se que o método apresentou 38 falsos negativos e 18 “falsos positivos”, em relação ao “Padrão Ouro”. Os resultados falso-negativos podem ter sido ocasionados por diversas razões, dentre elas se destacam: a alta variabilidade genética de *S. mansoni*, que pode ter resultado em alteração dos antígenos catódicos circulantes produzidos, o que contribuiria para diferenças de desempenho do teste diagnóstico (Stothard *et al.*, 2009); ao fato da quantidade de CCA regurgitada por vermes adultos e juvenis ser, certamente, variável ao longo dos dias e do próprio dia (Standley *et al.*, 2010) e; após a realização de tratamentos quimioterápicos, os ovos de *S. mansoni* poderem continuar a ser expelidos, pelo hospedeiro, mesmo após a eliminação dos vermes adultos (Standley *et al.*, 2010). Em relação aos indivíduos diagnosticados como positivos, somente pelo teste rápido de urina (“falsos positivos”), podem ter as seguintes explicações: os hospedeiros eram parasitados por vermes adultos, mas em período pré-patente ou porque havia um pequeno número de fêmeas grávidas, as quais produziram uma quantidade de ovos abaixo do limiar de detecção por meio dos métodos parasitológicos (Berhe *et al.*, 2004; Stothard *et al.*, 2006); a detecção do traço, em determinados casos, depende da acuidade visual do avaliador do teste, o que é variável entre dois examinadores (van Dam *et al.*, 2004). No entanto, no presente estudo, o teste foi realizado por um único examinador, o qual foi devidamente treinado e ainda contou com o auxílio de imagens impressas durante a realização do exame, o que, portanto, exclui essa possibilidade.

Como não se pode afirmar o real diagnóstico desses indivíduos, visto que não se teve um diagnóstico direto, o método, então, foi novamente analisado, mas considerando os 18 indivíduos diagnosticados, apenas no teste rápido de urina (CCA), como negativos. Ao adotar tal medida, o número de indivíduos positivos reduziu para 71 dentre os 194 participantes, o que diminuiu a prevalência para 36,60%. A sensibilidade foi reduzida para 65,14% enquanto que a concordância entre o POC-CCA e o “Padrão Ouro” permaneceu boa (Kappa = 0,621).

Em estudo realizado com escolares no distrito de Mayuge em Uganda, Lamberton *et al.* (2014) avaliou a sensibilidade dos métodos Kato-Katz com duas lâminas e POC-CCA. O primeiro método apresentou uma sensibilidade de 98,6%, enquanto a do segundo foi de 91,7% sendo, portanto, uma diferença não significativa.

Entretanto, o presente estudo, encontrou resultados contrários aos apresentados por Lamberton *et al.* (2014). Ao avaliarmos a combinação entre os métodos Kato-Katz e POC-

CCA foi observada uma prevalência de 42% (76/181), mas com uma taxa de positividade apresentada pelo teste rápido de urina (38,67%) significativamente maior ($p < 0,001$) do que a registrada pelo AM 1 K1-K2 (23,76%).

A carga parasitária do verme adulto *Schistosoma mansoni* não pode ser quantificada de modo preciso, devido à localização do parasito no hospedeiro. Entretanto, a estimativa da carga parasitária pode ser realizada a partir do número de ovos por grama de fezes (OPG), na qual uma contagem de 1-99 OPG indica uma baixa infecção, 100-399 média infecção e acima de 399 uma alta infecção (WHO, 2002).

Em nosso estudo, o número de ovos por grama de fezes foi detectado por meio dos métodos quantitativos Kato-Katz (AM 1 K1-K2 e AM 1 K1-K12) e gradiente salino. Embora as metodologias tenham sido coerentes na classificação da população, os valores das cargas parasitárias não foram concordantes, pois a média do AM 1 K1-K2 foi de 90 OPG, a do AM 1 K1-K12 equivaleu a 75 OPG, enquanto a do gradiente salino foi de 45 ovos por grama de fezes. Dessa forma, verificou-se que a carga parasitária média diminui com o aumento do número de lâminas ou de conteúdo fecal analisado. Uma possível explicação é o fato das amostras serem oriundas de pacientes residentes em área de baixa endemicidade e, portanto, manifestam uma reduzida e intermitente eliminação de ovos no bolo fecal, cuja situação semelhante foi observada por Enk *et al.* (2007) e Pinheiro *et al.* (2012). Outro fato observado foi que, para uma mesma quantidade de fezes utilizada entre o Kato-Katz e o gradiente salino, este também apresentou menor carga parasitária. Nesse caso, a variação de ovos inter-amostral foi descartada, visto que tanto o gradiente salino quanto as doze lâminas de Kato-Katz foram elaborados a partir da mesma amostra, a qual foi homogeneizada e dividida entre os diferentes métodos parasitológicos. Essa menor detecção da carga parasitária, possivelmente, se deve ao modo pelo qual as amostras são processadas no gradiente salino, uma vez que vários ovos podem ser perdidos ao longo da coluna de separação ou durante a transferência dos sedimentos do equipamento para a lâmina.

Em estudos comparativos, como este, o conhecimento acerca do OPG dos pacientes é importante, pois é sabido que uma das principais falhas relacionadas aos métodos diagnósticos, para a esquistossomose, é a baixa sensibilidade na detecção de indivíduos com baixa carga parasitária (Enk *et al.*, 2008). Sendo assim, o desempenho de cada método foi avaliado, em relação ao OPG encontrado por duas lâminas de Kato-Katz.

Todos os métodos, excetuando-se o centrífugo-sedimentação, apresentaram um excelente desempenho no diagnóstico de indivíduos com moderada ou alta carga parasitária,

visto que todos esses indivíduos foram diagnosticados por todos os métodos. Entretanto, o desempenho de cada método foi bastante heterogêneo, no diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária:

- O método centrífugo-sedimentação apresentou o menor desempenho (5%), enquanto a técnica Helmintex® se mostrou como a de melhor desempenho (82,22%);
- O desempenho do Kato-Katz refletiu significativa melhora ao aumentar o número de lâminas, de duas (AM 1 K1-K2 = 32%) para seis (AM 1 K1-K6 = 48,94%) e obteve o seu melhor desempenho ao examinar três amostras (AM 1-3 K1-K2 = 59,78%); Ressalta-se que a diferença de desempenho entre seis e doze lâminas não se mostrou significativa e, portanto, recomenda-se o uso de no máximo seis lâminas de uma mesma amostra.
- Não houve uma diferença significativa do desempenho obtido entre a análise de 500 mg de fezes pelo gradiente salino (39,02%) e a mesma quantidade de fezes pelo Kato-Katz (52,13%).
- O desempenho do POC-CCA (60%) foi igual ao apresentado por AM 1-3 K1-K2 (59,78%).

Em estudo realizado por Adriko *et al.* (2014), em escolas do município de Bugiri, Uganda, foi avaliada a prevalência e intensidade da infecção por meio dos métodos Kato-Katz e POC-CCA. As prevalências observadas aumentaram, tanto pelo Kato-Katz, quanto pelo teste rápido de urina, à medida que o grau de infecção (leve, moderado inferior ou moderado superior) aumentou o que conflui com os achados do presente estudo. Entretanto, Adriko *et al.*, 2014 observou que a prevalência obtida pelo teste rápido de urina foi significativamente maior a qualquer variação do Kato-Katz, independente da intensidade da infecção, o que diverge dos dados apresentados no presente estudo.

A fim de se obter um melhor desempenho na detecção dos indivíduos com infecção de baixa intensidade, nosso estudo realizou a combinação e comparação entre diferentes métodos tendo o Helmintex® e o Kato-Katz com duas lâminas como referência.

As combinações entre Helmintex® e gradiente salino ou entre Helmintex® e AM1 K1-K2 apresentaram prevalências semelhante à observada pelo “Padrão Ouro”, ou seja, 46,80%, 45,41% e 45,91%, respectivamente. O mesmo foi observado quanto às taxas de

positividade (88,79% para a primeira e 90,91% para a segunda). O aumento do número de lâminas combinadas com o Helmintex® não resultou em uma prevalência (AM1 K1-K6 = 47,92%; AM1 K1-K12 = 48,95% e AM1 K1-K14 = 48,69%) e em uma taxa de positividade (AM1 K1-K6 = 92,93%; AM1 K1-K12 = 93,94% e AM1 K1-K14 = 93,94%) significativamente maior do que a obtida com duas lâminas de Kato-Katz. Entretanto, o aumento do número de amostras analisadas pelo Kato-Katz (AM1-3 K1-K2), combinado com o Helmintex® registrou uma prevalência de 56,29%, a qual foi significativamente maior do que a detectada pelo “Padrão Ouro”. Além disso, a combinação foi capaz de detectar 94 positivos dentre os 96 analisados pela combinação, o que acarretou em uma taxa de positividade de 97,92%. Sendo assim, percebe-se que a combinação de três amostras fecais com o Helmintex® foi a que detectou a maior prevalência e a maior taxa de positividade e, portanto, a combinação ideal para inquéritos epidemiológicos, baseados somente em análises coprológicas.

A combinação entre o Helmintex® e o POC-CCA indicou uma prevalência superior (54,44%) à do “Padrão Ouro” (45,91%). A combinação diagnosticou corretamente 92 indivíduos, dentre os 98 detectados pelo “Padrão Ouro”, o que representa uma taxa de positividade de 93,88%.

Dessa forma, os melhores resultados, para as diferentes combinações do Helmintex®, foram com as metodologias AM 1-3 K1-K2 e POC-CCA, as quais apresentaram desempenho semelhante no diagnóstico da esquistossomose.

O emprego de duas lâminas de Kato-Katz (AM 1 K1-K2), associadas ao método MIFC, apresentou os piores resultados dentre todas as combinações analisadas, uma vez que a combinação indicou uma prevalência de 21,12% e uma taxa de positividade de 42,61%.

A prevalência observada para a combinação entre o AM 1 K1-K2 e o gradiente salino (27,75%) foi consideravelmente inferior à observada pelo “Padrão Ouro”. A taxa de positividade foi de 57,61%, o que indica que somente 53 positivos, dentre os 92 possíveis, foram corretamente diagnosticados.

A prevalência observada (42%), com a combinação entre AM 1 K1-K2 e teste rápido de urina, foi semelhante à do “Padrão Ouro”. Entretanto, a combinação diagnosticou corretamente apenas 76 indivíduos dos 108 positivos, o que representa uma taxa de positividade de 70,37%. Sendo que esses 32 falsos negativos apresentaram baixa carga parasitária.

Sendo assim, as prevalências obtidas por meio das combinações entre AM 1 K1-K2 e POC-CCA (42%) ou Helmintex® (45,41%) foram semelhantes à observada pelo “Padrão Ouro” (45,91%). Entretanto, a taxa de positividade obtida com a primeira (70,37%) foi significativamente menor do que com a segunda (93,94%). Dessa forma, percebe-se que, a partir da leitura de duas lâminas de Kato-Katz, a combinação entre AM 1 K1-K2 e Helmintex® foi a mais eficaz na tentativa de se estimar a real prevalência de uma dada localidade.

A prevalência também se mostrou semelhante quando foi realizada a combinação entre os métodos AM 1 K1-K6 e teste rápido de urina, a qual detectou 45,83% de positivos (77/168). A combinação detectou uma taxa de positividade de 75,49%, ou seja, 77 pacientes foram corretamente diagnosticados, dentre os 102 possíveis.

A última combinação analisada foi entre os métodos AM 1-3 K1-K2 e POC-CCA, a qual detectou uma prevalência de 52,7% (79 positivos em 150 pacientes). Esse valor é maior do que o encontrado pelo “Padrão Ouro” (45,91%) e semelhante aos valores detectados pelas combinações entre AM 1-3 K1-K2 e Helmintex® (56,2%), e também entre Helmintex® e POC-CCA (54,44%). Em relação ao “Padrão Ouro”, a combinação diagnosticou 21 pacientes como falsos negativos, todos com baixa carga parasitária, o que resultou em uma taxa de positividade de 79%.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as diferentes metodologias e combinações empregadas no diagnóstico da esquistossomose mansoni, nenhuma foi capaz de detectar todos os indivíduos positivos para a doença. Sendo assim, com o intuito de se obter um melhor desempenho no diagnóstico da esquistossomose, o presente estudo realizou a combinação e comparação entre diferentes métodos tendo o Helmintex® e o Kato-Katz como referência. Para as diferentes combinações do Helmintex®, os melhores resultados foram obtidos com as metodologias AM 1-3 K1-K2 e Teste rápido de urina (POC-CCA), as quais, de modo semelhante, apresentaram elevada prevalência e taxa de positividade, no diagnóstico da esquistossomose. Em relação ao Kato-Katz, a melhor combinação foi obtida entre o AM 1-3 K1-K2 e o POC-CCA. Apesar disso, este estudo considera que a combinação entre AM 1 K1-K6 e POC-CCA é a de melhor aplicabilidade em estudos epidemiológicos, uma vez que são técnicas de baixo custo, fácil execução e que demandam baixo volumes amostrais, o que a torna operacionalmente aplicável em atividades de campo. Não obstante, o presente estudo sugere a realização de novos estudos a fim de se confirmar tais achados.

8. ANEXOS

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Novas técnicas de diagnóstico para Schistosoma mansoni e geohelminhos.

Pesquisador: Paulo Marcos Zech Coelho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21824513.9.0000.5091

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPQRR/

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 518.888

Data da Relatoria: 27/01/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto: Schistosoma mansoni e geohelminhos e 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, coordenado por Dr. Paulo Marcos Zech Coelho do CPQRR e equipe de pesquisadores de outras quatro instituições. Recursos do DCIT totalizando R\$650.000,00

Objetivo da Pesquisa:

Meta: Realizar estudos parasitológicos, epidemiológicos e imunológicos em áreas de média a baixa endemicidade para a esquistossomose mansoni, visando obter uma visão real e atual dos aspectos de transmissão e morbidade associados à infecção por Schistosoma mansoni e geohelminhos que permita a proposição de estratégias de controle e tratamento compatível com realidade da doença e com a atuação do sistema de saúde.

Objetivos específicos:

1. Levantamento da prevalência da infecção por S. mansoni e geohelminhos em áreas da Amazônia, baía de Maranhense e Norte de Minas Gerais, onde as características de transmissão da infecção humana por helmintos são bastante diferenciadas.
2. Comparação da sensibilidade do método de Kato-Katz com os novos testes diagnósticos (Helmintex, gradiente, CCA modificado e PCR) para monitoramento da transmissão e cura após

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

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

Continuação do Parecer: 518.888

tratamento.

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Benefícios:

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

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

Continuação do Parecer: 518.888

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

BELO HORIZONTE, 31 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Naftale Katz
(Coordenador)

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

9 REFERÊNCIAS

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

AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, suppl. I, p. 79-85, 2006.

BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S. M. L.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B.; DE MORAES, C.N. L.; SPINELLI, V. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 725-728, 2001.

BARBOSA, C. S.; MONTENEGRO, S. M. L.; ABATH, F. G.; DOMINGUES, A. L. Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p.169-72, 2001.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na Ilha de Itamaracá, Pernambuco. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n. 4, p. 337-41, 2000.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. Esquistossomose: reprodução e expansão da epidemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 609-616, 1996.

BERHE, N.; MEDHIN, G.; ERKO, B.; SMITH, T.; GEDAMU, S.; BEREDED. D.; MOORE, R.; HABTE, E.; REDDA, A.; GEBRE-MICHAEL, T.; GUNDERSEN, S. G.; Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop**, Basel, v. 92, p. 205-212, 2004.

BILHARZ, T. M. Fernere Beobachtungen über die die Pfortader des Menschen bewohnende *Distonum haematobium* und sein zu gewissen. **Wschift Zol Leipzig**, v. 4, p. 72-76, 1852.

BLACK, C. L.; MWINZI, P. N.; MUOK, E. M.; ABUDHO, B.; FITZSIMMONS, C. M.; DUNNE, D. W.; KARANJA, D. M.; SECOR, W. E.; COLLEY, D. G. Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human Schistosomiasis *Mansoni*. **Plos Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 4, p. 637, 2010.

BLAGG, W.; SCHOEGEL, E. L.; MANSOUR, N. S.; KHALAT, G. I. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore v. 4, p. 23- 28, 1955.

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

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

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

CESARI, I. M.; BALLEEN DE, MENDOZA, L.; MATOS, C. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. **Clin Diagn Lab Immuno**, Washington, v. 112, p. 280-286, 2005.

CHIEFFI, P. P.; KANAMURA H. Diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica. **Rev Bras Malariol Doenças Trop**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 77-97, 1978.

CHITSULO, L.; ENGELS D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop**, Basel, v. 77: p. 41–51, 2000.

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

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

CONCEIÇÃO, M. J.; COURA, J. R. Morbidade da esquistossomose mansoni em uma comunidade rural de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 12, n. 1, 1978.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, suppl.1, p. 13-19, 2004.

COURA-FILHO, P.; FARAH, M. W. C.; DE REZENDE, D. F.; LAMARTINE, S. DA S.; CARVALHO, O. S.; KATZ, N. Determinantes Ambientais e Sociais da esquistossomose mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n.2, p. 254-265, 1995.

DA FROTA, S. M.; CARNEIRO, T. R.; QUEIROZ, J. A.; ALENCAR, L. M.; HEUKELBACH, J.; BEZERRA, F. S. Combination of Kato-Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. **Acta Trop**, Basel, v. 120, p. 138-141, 2011.

DECIT, Departamento de Ciência e Tecnologia. Doenças Negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

DE JONGE, N.; KREMSNER, P. G.; KRIJGER, F. W.; SCHOMMER, G.; FILLIE, Y. E.; KORNELIS, D.; VAN ZEYL, R. J. M.; VAN DAM, G. J.; FELDMEIER, H.; DEELDER, A. M. Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v. 84, p. 815-818, 1990.

DE JESUS, A. R.; SILVA, A.; SANTANA, L. B.; MAGALHÃES, A.; DE JESUS, A. A.; DE ALMEIDA, R. P.; RÊGO, M. A.; BURATTINI, M. N.; PEARCE, E. J.; CARVALHO,

E. M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute Schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis**, Chicago, v. 185, p. 98 -105, 2002.

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

DEELDER, A. M.; DE JONGE, N.; BOERMAN, O. C.; FILLIE, Y. E.; HILBERATH, G. W.; ROTMANS, J. P.; GERRITSE, M. J.; SCHUT, D. W. O. A. Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 40, p. 268-272, 1989.

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

EBRAHIM, A.; EL-MORSHEDY, H.; OMER, E.; EL DALY S.; BARAKAT, R. Evaluation of the Kato–Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 57, p. 706–708, 1997.

ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSEELS, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **Am J Trop Med Hyg**. Baltimore, v. 54, p. 319-324, 1996.

ENK, M. J. **Análise crítica da metodologia estabelecida para determinar prevalência e controle de esquistossomose em área de baixa endemicidade (Chonim de Cima, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil); recomendações de novas abordagens integradas**. 2007. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2007.

ENK, M. J. ; AMARAL, G. L. ; SILVA, M. F. G. ; SILVEIRA-LEMOS, D. ; TEIXEIRA-CARVALHO, A. ; MARTINS-FILHO, O. A. ; CORREA-OLIVEIRA, R. ; GAZINNELLI, G. ; COELHO, P. M. Z. ; MASSARA, C. L. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, 2010.

ENK, M. J.; CALDEIRA, R.L.; CARVALHO, O.S.; SCHALL, V.T. Rural tourism as risk factor for the transmission of schistosomiasis in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, Suppl. 1, p.105-8, 2004.

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

FARID, Z. Schistosomes with terminal-spined eggs: pathological and clinical aspects. In: JORDAN, P. et al. **Human schistosomiasis**. Wallingford, England: CAB International, 1993.

FELDMEIER, H.; POGGENSEE, G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. **Acta Tropica**, Basel, v. 52, p. 205-220, 1993.

FLEMING, F. M.; BROOKER, S.; GEIGER, S. M.; CALDAS, I. R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. **Trop Med Int Health**, Oxford, v. 11, p. 56-64, 2006.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 9-10, 1999.

GRENFELL, R.; HARN, D. A.; TUNDUP, S.; DA'DARA, A.; SIQUEIRA, L.; COELHO, P. M. New approaches with different types of circulating cathodic antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. **Plos Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 7, p. e2054, 2013.

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

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

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **J Public Health**, Puerto Rico, v. 9, p. 283-91, 1934.

KATO, T.; MIURA, M. On the comparison of some stool examination methods. **Jpn J Parasitol**, Tokyo, v.3, p.35, 1954.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thicksmear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 14, p. 397- 400, 1972.

KATZ, N.; ZICKER, F.; ROCHA, R.S; OLIVEIRA, V.B. Re-infecção de pacientes em áreas endêmicas esquistossomose mansônica após o tratamento específico. I. Influência da idade e peso desgastado. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 20: p. 273-314, 1978.

KREMSNER, P. G.; ENYONG, P.; KRIJGER, F. W.; DE JONGE, N.; ZOTTER, G. M.; THALHAMMER, F.; MÜHLSCHLEGEL, F.; BIENZLE, U.; FELDMEIERS, H.; DEELDER, A. M. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine from *Schistosoma haematobium* infected Cameroonian children receiving praziquantel: a longitudinal study. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 18, p. 408-413, 1994.

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

LAMBERTUCCI, R. J. *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects. In: JORDAN, P. et al. **Human schistosomiasis**. Wallingford, England: CAB International. 1993.

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

LEIPER, R. T. Report on the results of the bilharzia mission in Egypt. **J R Army Med Corps**, London, v. 25, p. 147-191, 1915.

LIN, D. D.; LIU, J. X.; LIU, Y. M.; HU, F.; ZHANG, Y. Y.; XU, J. M.; LI, J. Y.; JI, M. J.; BERGQUIST, R.; WU, G. L.; WU, H. W. Routine Kato-Katz technique underestimates the

prevalence of *Schistosoma japonicum*: a case study in an endemic area of the People's Republic of China. **Parasitol Int**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 281-286, 2008.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.11, p. 121-155, 1919.

MASSARA, C. L.; AMARAL, G. L.; CALDEIRA, R. L.; DRUMMOND, S. C.; ENK, M. J.; CARVALHO, O. S. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 7, p. 1709-1712, 2008.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a esquistossomose. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p.209-29.

NOYA, B. A.; RUIZ-GUEVARA, R.; COLMENARES, C.; LOSADA, S.; NOYA, O. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, suppl. I, p. 29-35, 2006.

OLIVEIRA, R. R.; FIGUEIREDO, J. P.; CARDOSO, L. S.; JABAR, R. L.; SOUZA, R. P.; WELLS, M. T.; CARVALHO, E. M.; FITZGERALD, D. W.; BARNES, K. C.; ARAÚJO, M. I.; GLESBY, M. J. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* Infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 86, p. 296-305, 2012.

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

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, p. 669-676, 1997.

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

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

ROCHA, M. O.; MELLO, R. T.; Exame Parasitológico de Fezes. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p.509-22.

SAMBON, L. W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 10, p. 303-304, 1907.

SIQUEIRA, L. M. V. **Avaliação de métodos diagnósticos para esquistossomose mansoni em uma área de baixa endemicidade no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias). Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2011.

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

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, New York, v. 6, p. 411-425, 2006.

STOTHARD, J. R.; KABATEREINE, N. B.; TUKAHEBWA, E. M.; KAZIBWE, F.; ROLLINSON, D.; MATH-IESON, W.; WEBSTER, J. P.; FENWICK, A. Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. **Acta Trop**, Basel, v. 97, p. 219–228, 2006.

STOTHARD, J. R.; WEBSTER, B. L.; WEBER, T.; NYAKAANA, S.; WEBSTER, J. P.; KAZIBWE, F.; KABATEREINE, N. B.; ROLLINSON, D. **Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni* in Uganda: DNA barcoding reveals substantive genetic diversity within Lake Albert and Lake Victoria populations**. *Parasitology*, London, v. 136, p. 1813-1824, 2009.

TEIXEIRA, C. F.; NEUHAUSS, E.; BEM, R.; ROMANZINI, J.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. **Plos Negl Trop Dis**, San Francisco, v.1, p. e73, 2007.

TOMÉ, C. M.; CIPOLLI, E.; COELHO DA SILVA C. L. P. A.; BORGES, D. A.; Soares, M. S. **Esquistossomose na estância turística de Holambra (SP, Brasil)**. In: 9º Simpósio Internacional sobre Esquistossomose, 2003, Bahia. Belo Horizonte: Programa Integrado de Esquistossomose, Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 68.

UTZINGER, J. et al. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Trop**, Basel, v. 120, Suppl 1, p. 121–37, 2011.

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

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

VAN DAM, G. J.; WICHERS, J. H.; FERREIRA, T. M. F.; GHATI, D.; VAN AMERONGEN, A.; DEELDER, A. M. **Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen**. *J Clin Microbiol*, Washington 2004, v. **42**, p. 5458-5461, 2004.

VAN DER WERF, M. J.; DE VLAS, S. J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C. W.; NAGELKERKE, N. J.; HABBEMA, J. D.; ENGELS, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop**, Basel, v. 89, p. 125-139, 2003.

VAN ETEN, L.; FOLMAN, C. C.; EGGELTE, T. A.; KREMSNER, P. G.; DEELDER, A. M. Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 32, p. 2404 - 2406, 1994.

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

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A. M.; DEELDER, A. M. Immunodiagnosis of Schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. **Acta Trop**, Basel, v. 77, p. 69–80, 2000.

VAN 'T WOUT, A. B.; DE JONGE, N.; TIU, W. U.; GARCIA, E.E.; MITCHELL, G. F.; DEELDER, A. M. Schistosome circulating anodic antigen in serum of individuals infected with *Schistosoma japonicum* from The Philippines before and after chemotherapy with praziquantel. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, London, v. 86, p. 410-413, 1992.

WARREN, K. S. The pathology, pathobiology and pathogenesis of schistosomiasis. **Nature**, London, v. 273, p. 609-612, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites**. Geneva, 1994. 23 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bench Aids for the Diagnosis of Intestinal Parasites**. 1994. Disponível em: >
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37323/1/9789241544764_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 13 out 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Helminth control in school-age children: A guide for managers of control programmes**. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pan American Health Organization. **49 th directing council: 61st session of the regional committee - Resolution CD49.R19: Elimination of neglected diseases and other poverty-related infections**. USA, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pan American Health Organization. **Key facts on Neglected Infectious Diseases: Schistosomiasis**. 2014. Disponível em: <<file:///C:/Users/TEMP/Documents/2014-cha-schistosomiasis-factsheet.pdf>>. Acesso em: 12 out 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pan American Health Organization. **Schistosomiasis**. 2014. Disponível em: < <http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/02/Schistosomiasis.pdf>>. Acesso em: 13 out 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis**. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis**. Geneva, 2005. 123 p.

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

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

ZHAO, G.; LI, J.; BLAIR, D.; LI, X.; ESLSHEIKHA, H. M.; LIN, R.; ZOU, F.; ZHU, X. Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 6, p. 1381-1389, 2012.