



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TEILIANE RODRIGUES CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM  
AMOSTRAS DE FEZES, PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE EM  
REGIÃO DE BAIXA ENDEMICIDADE, NO ESTADO DO CEARÁ.**

**FORTALEZA**

**2011**

TEILIANE RODRIGUES CARNEIRO

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS  
DE FEZES, PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE EM REGIÃO DE  
BAIXA ENDEMICIDADE, NO ESTADO DO CEARÁ.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade  
Federal do Ceará, como um dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

**Prof. Dr. Fernando Schemelzer Moraes Bezerra**

Co-orientadora:

**Profa. Dra. Regina Helena Saramago Peralta**

**FORTALEZA**

**2011**

**TEILIANE RODRIGUES CARNEIRO**

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS DE FEZES, PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE EM REGIÃO DE BAIXA ENDEMICIDADE, NO ESTADO DO CEARÁ.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Danielle Malta Lima (Membro)  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

---

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota (Membro)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira (Membro)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*O dia mais belo? Hoje.*

*A estrada mais rápida? O caminho correto.*

*O resguardo mais feliz? O sorriso.*

*A força mais potente do mundo? A fé.*

*A maior satisfação? O dever cumprido.*

*A coisa mais bela de todas? O amor.*

*Madre Teresa de Calcutá*

*A minha família, que é meu alicerce de vida,  
que está ao meu lado, em todos os momentos.  
Sem dúvida, meus melhores amigos.*

*Ao meu namorado e aos meus amigos, que me  
incentivaram e ajudaram durante mais esta  
etapa de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos, me dando forças para superar todas as dificuldades e permitindo a realização dos meus projetos.

Aos meus pais Antônio e Selma, por toda sua dedicação, amor e apoio, em todos os momentos de minha vida. A quem devo tudo o que sou e o que ainda serei.

À minha irmã Tatiane, pela amizade e ajuda constante, pelo exemplo, amor e cuidado a mim concedidos, sempre.

Ao meu namorado Ricardo, pelo apoio, compreensão e amor dedicados. Ao lado de quem, na prática, tudo vira felicidade.

Ao Prof. Dr. Fernando Bezerra, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, desde a iniciação científica, pela confiança depositada, pela orientação desta dissertação e pelos ensinamentos.

A Profa. Dra. Regina Peralta, da Universidade Federal Fluminense, minha co-orientadora, pelo auxílio na execução e redação desta dissertação, pelo acolhimento em sua casa, por toda paciência, confiança, estímulo e pelos inúmeros ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Mauro Peralta, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, meu orientador “extra-oficial”, por todo apoio, investimento e tempo dedicados. Sinceros agradecimentos e enorme admiração.

A minha anjinha, Bárbara Dutra, pela amizade, companheirismo e parceria inestimável na execução deste trabalho.

A minha amiga, Thaís Helena, pelo auxílio constante nos experimentos, pelas conversas, recheadas de frases de efeito, e pelos inúmeros sorrisos compartilhados.

Ao meu amigo, Jáder Canuto, por toda alegria vivenciada, inclusive nos sábados de trabalho, pelo carinho, apoio e conforto, a mim concedidos.

A toda a equipe do Laboratório de Diagnóstico Imunológico e Molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFRJ, em especial, Flávia, Mariana, Leonardo, Thiago Gomes e Thiago Lima, uma equipe muito simpática, competente e prestativa, com a qual tive o privilégio de conviver. Muito obrigada, por toda disponibilidade, ajuda e ensinamentos.

A todos do LPPBM, em especial, Marta, Sara, Vanessa, Ana Lúcia, Lorena, Morgana, Luana, Mônica e Natália, pelos laços de amizade construídos, pela paciência e por sempre estarem prontas para colaborar, sem medir esforços.

Aos meus amigos-irmãos, em especial, Amanda Scipião, Camila Façanha, Bruno Chaves e Bruno Neves, por ouvirem minhas angústias e dúvidas, por ser porto seguro para mim.

Aos colegas de turma do curso de mestrado, em especial, ao meu amigo Augusto César, pelo apoio, incentivo e companheirismo, que me são essenciais.

À coordenação do mestrado, que através do PROAP, possibilitou realização de parte deste estudo na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À Secretaria de Saúde de Maranguape, na pessoa do Dr. Eduardo Maia - coordenador do Serviço de Controle de Zoonoses, assim como aos funcionários deste setor, que ajudaram nos trabalhos de campo.

Ao Prof. Alfredo Góes, do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter fornecido o antígeno para realização da sorologia.

Ao Prof. Vagnaldo, da UNIFAC-UFC, e ao Leonardo Peres, pela ajuda com as análises estatísticas.

A Profa. Fátima Oliveira por seu carinho e apoio, durante esses anos de convivência.

À CAPES pela bolsa a mim concedida.

A todos enfim, que direta ou indiretamente contribuíram nesse trabalho, o meu agradecimento sincero. Muito Obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Distribuição global das várias espécies de <i>Schistosoma</i> .....	16
FIGURA 2	Distribuição da esquistossomose.....	17
FIGURA 3	Formas evolutivas do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	21
FIGURA 4	Conchas das espécies de <i>Biomphalaria</i> .....	22
FIGURA 5	Ciclo de vida <i>Schistosoma mansoni</i> .....	24
QUADRO 1	Classificação da comunidade segundo a prevalência* das infecções por esquistossomose.....	27
FIGURA 6	Localização do município de Maranguape e da área de estudo.....	37
FIGURA 7	Fotos da localidade do Planalto do Cajueiro-Maranguape – CE.....	38
FIGURA 8	Amostragem total testada pelas técnicas sorológica e coproscópicas.....	38
FIGURA 9	Formação dos cinco grupos testados pela técnica molecular de PCR.....	39
FIGURA 10	Preparação do método do Kato – Katz.....	42
FIGURA 11	Salas e equipamentos específicos para Biologia Molecular.....	44
FIGURA 12	Técnica de extração do DNA segundo protocolo de Santos <i>et al.</i> ,2007....	45
FIGURA 13	Densidade óptica dos 125 indivíduos que realizaram o teste ELISA para IgG anti- <i>S. mansoni</i> . Indivíduos residentes na localidade do Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	49
FIGURA 14	Distribuição do número de indivíduos positivos para <i>S. mansoni</i> , por lâmina analisada, detectados através do método de Kato – Katz - Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	50
FIGURA 15	Número de parasitos detectados pelo método de Hoffman, nos indivíduos em estudo, da localidade Planalto do Cajueiro.....	51
FIGURA 16	Densidade óptica obtida pelo teste ELISA para IgG anti- <i>S. mansoni</i> , dos 56 indivíduos que compuseram a amostragem analisada pela técnica de PCR. Indivíduos do Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	52
FIGURA 17	Distribuição do número de indivíduos positivo para <i>S. mansoni</i> , por método coproscópico realizado, em indivíduos do Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	52
FIGURA 18	Número de parasitos detectados pelo método de Hoffman, nos 56 indivíduos do Grupo B, provenientes da localidade Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	53
FIGURA 19	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas amostras do Grupo I.....	58
FIGURA 20	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas amostras do Grupo II.....	58
FIGURA 21	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas amostras do Grupo III.....	58
FIGURA 22	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas amostras do Grupo IV.....	59
FIGURA 23	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas amostras do Grupo V.....	59
FIGURA 24	Prevalências da esquistossomose mansoni, detectadas através dos métodos de Kato – Katz, Gradiente Salínico, Helmintex® e PCR-Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	62
FIGURA 25	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas 17 amostras extraídas pelo Kit Fast DNA.....	63
FIGURA 26	Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas 17 amostras extraídas pelo protocolo de Santos <i>et al.</i> ,2007 .....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Resultados dos métodos de realizados nas amostras de fezes do Grupo I (A1-A10) e do Grupo II (B1-B10), amostras de indivíduos residentes em Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	55
TABELA 2	Resultados dos métodos de realizados nas amostras de fezes do Grupo III (C1-C7) e do Grupo IV (D1-D10), amostras de indivíduos residentes em Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	56
TABELA 3	Resultados dos métodos de Kato-Katz, Gradiente Salínico, Helmintex e PCR das 19 amostras de fezes positivas na coproscopia, Grupo V (E1-E19), provenientes de indivíduos residentes em Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.....	57
TABELA 4	Comparação entre os métodos Kato-Katz e PCR na detecção da esquistossomose mansoni. Número amostral = 19. Dados analisados pelo teste de McNemar para variáveis categóricas emparelhadas.....	60
TABELA 5	Comparação entre os métodos PCR e Gradiente Salínico na detecção da esquistossomose mansoni. Número amostral=17. Dados analisados pelo teste de McNemar para variáveis categóricas emparelhadas.....	60
TABELA 6	Comparação entre os métodos PCR e Helmintex <sup>®</sup> na detecção da esquistossomose mansoni. Número amostral=13. Dados analisados pelo teste de McNemar para variáveis categóricas emparelhadas.....	61

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DTN - Doenças tropicais negligenciadas

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – “Enzyme linked immunosorbent assay”

ESTs – Etiquetas de Sequências Transcritas

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde

LPPBM – Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos

Kb – Kilobases, unidade correspondente a mil pares de bases

pb – Pares de bases

MHC - Complexo de histocompatibilidade

OPG - Ovos por grama de fezes

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCE - Programa de Controle da Esquistossomose

rDNA – DNA ribossomal

RNase – Enzima que degrada especificamente o RNA

rRNA – RNA ribossomal

WHO – World Health Organization

## RESUMO

A esquistossomose ainda é um problema de saúde pública no Brasil, amplamente disseminada nas regiões sudeste e nordeste. O diagnóstico laboratorial dessa doença é realizado principalmente através de métodos diretos que detectam os ovos nas fezes, através da microscopia e por métodos indiretos, que se baseiam na determinação e identificação de antígenos, anticorpos e fragmentos específicos de DNA que estão associados à infecção por *Schistosoma mansoni*. Nesse estudo, objetivamos avaliar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico da esquistossomose mansoni, em indivíduos da localidade de Planalto do Cajueiro, uma área de baixa endemicidade, em Maranguape- Ceará. Realizamos o método de ELISA, para detecção de anticorpos IgG contra antígenos de verme adulto de *S. mansoni*, e a coprocopia, pelos métodos de Kato-Katz e de Lutz, para detecção de ovos de *S. mansoni* e de outros parasitos. Diante dos resultados obtidos nesses métodos, selecionamos 56 amostras de fezes, dentre as 125 analisadas, que compuseram os seguintes grupos: Grupo I - ELISA reativo/Outros parasitos (+) ; Grupo II- ELISA reativo/Outros parasitos (-); Grupo III- ELISA não reativo/ Outros parasitos (+) ; Grupo IV-ELISA não reativo/Outros parasitos (-); Grupo V- ELISA Reativo/Coproscopia para *S. mansoni* (+). Os parâmetros da PCR seguiram o protocolo de Pontes *et al.*, 2002. Do Grupo I, 02 das 10 amostras foram positivas na PCR; do Grupo II, 04 das 10 amostras foram positivas na PCR e no Grupo III, 01 das 07 amostras foi positiva no PCR. Dentre as 10 amostras do Grupo IV, 01 amostra foi positiva no PCR e no Grupo V, 13 das 19 amostras foram positivas no PCR. Dos 39 indivíduos que apresentavam reatividade pelo ELISA, o exame parasitológico, realizado pela técnica de rotina, método de Kato-Katz, foi positivo em 06 amostras e a PCR em 19 amostras. Ao comparar os resultados obtidos no Grupo V, com o método de Kato-Katz, observa-se que este detectou 06 indivíduos, enquanto PCR detectou 13. Ao compararmos PCR ao método do Gradiente Salínico, observa-se que o Gradiente Salínico detectou 09 indivíduos, enquanto PCR detectou 11. Ao compararmos PCR ao Helmintex<sup>®</sup>, verificamos que o Helmintex<sup>®</sup> detectou 10, enquanto PCR detectou 08 amostras. Diante disso, concluímos que a PCR é mais uma ferramenta importante para melhorar a sensibilidade na detecção do parasito nas fezes, sendo indispensável à associação dos vários métodos disponíveis, com intuito de alcançar o diagnóstico real da doença.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, Diagnóstico, Reação em cadeia da Polimerase.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is still a public health problem in Brazil. The infection is widespread in southeast and northeast. The laboratorial diagnosis of schistosome infection has been based on direct coproscopic examination and by indirect methods for detection of antigen, antibodies and specific DNA fragments that are associated with *Schistosoma mansoni* infection. The aim of the present study was to evaluate polymerase chain reaction (PCR) designed for detection of *Schistosoma mansoni* DNA in individuals from a low endemic area in Ceará state. The study was conducted in the Planalto do Cajueiro, Maranguape, Ceará, Brazil. In the laboratory performed the ELISA for detection of IgG antibodies against adult worms antigen of *S. mansoni*, and stool examinations (Kato-Katz, Lutz, Saline gradient and Helmintex<sup>®</sup> methods), considering the results obtained, for distribution of 56 stool samples selected among the 125 examined, in the following groups: Group I - ELISA reactive / Others parasites (+), Group II- ELISA reactive / Others parasites (-), Group III- ELISA non reactive / Others parasites (+), Group IV- ELISA non reactive / Others parasites (-), Group V- ELISA reactive / Coproscopic examination *S. mansoni* (+).The PCR was carried out according to a protocol described by Pontes *et al.*(2002) . Group I, 02 of 10 samples were positive in PCR; Group II, 04 of 10 samples were positive by PCR and in Group III, 01 of 07 samples were positive in PCR. Among the 10 samples of Group IV, 01 was positive in PCR and Group V, 13 of 19 samples were positive in PCR. Among the 39 individuals who showed reactivity by ELISA, 06 samples were positive in coproscopic examination and PCR was reactive in 19 samples. Comparing the results in Group V, with the Kato-Katz, this method detected 06 individuals, while PCR detected 13 individuals were positive. By comparing the PCR of Saline gradient, it is observed that the Saline gradient detected 09 individuals, while PCR detected 11. When comparing PCR to Helmintex<sup>®</sup>, we found that the Helmintex<sup>®</sup> detected 10, while PCR detected 08 samples. We conclude that PCR is an important tool to improve the sensitivity in detecting *S. mansoni* infection in low endemic areas. We emphasize that is very important associate the exams in order to achieve the real diagnosis of the disease.

Key-words: Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni* , Diagnosis, Polymerase chain reaction.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 ESQUISTOSSOMOSE: UMA VISÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 AGENTE ETIOLÓGICO - <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 CICLO DE VIDA DO <i>S. mansoni</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 PATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ESQUISTOSSOMOSE.....</b>	<b>26</b>
<b>1.7 TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE APLICADA A ESQUISTOSSOMOSE .....</b>	<b>30</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 AMOSTRAGEM.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1 Grupos de estudo.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1.1 Grupo A- Sorologia e Coproscopia.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1.2 Grupo B- Sorologia, Coproscopia e PCR.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2 Amostras controles.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.1 Coleta de sangue.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.2 Coleta de fezes.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5.1 Método Sorológico – Técnica de ELISA.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5.2 Métodos Coproscópicos.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5.2.1 Método de Kato-Katz.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5.2.2 Método de Lutz.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.3 Diagnóstico Molecular- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.3.1 Extração do DNA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.3.1.1. Protocolo de extração através de um método comercial.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.3.1.2. Protocolo de extração segundo Santos <i>et al.</i>,2007.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>	<b>45</b>
<b>3.5.3.3 Detecção do produto amplificado.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>47</b>
<b>3.7. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 RESULTADOS OBTIDOS PARA GRUPO A .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.1 SOROLOGIA- Método de ELISA.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.2 COPROSCOPIA.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.2.1 Método de Kato-Katz.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.2.2 Método de Lutz .....</b>	<b>50</b>

<b>4.2 RESULTADOS OBTIDOS PARA GRUPO B.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.1 SOROLOGIA- Método de ELISA.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.2 COPROSCOPIA.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.2.1 Método de Kato-Katz.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.2.2 Método de Lutz .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.3.1 Técnica de PCR.....</b>	<b>53</b>
<b>4.3 COMPARAÇÃO DAS PREVALÊNCIAS DETERMINADAS PARA O [Grupo V].....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....</b>	<b>62</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. ESQUISTOSSOMOSE: UMA VISÃO GERAL

Classificada entre as doenças tropicais negligenciadas- DTN (Molyneux *et al.*, 2005; Hotez *et al.*, 2006), a esquistossomose continua sendo uma das mais importantes doenças parasitárias nos trópicos e regiões subtropicais, constituindo um importante problema de saúde pública (Van der Werf *et al.* 2003; Steinmann *et al.*, 2006).

A esquistossomose é conhecida do homem desde a antiguidade. A presença de ovos de *Schistosoma spp.* em vísceras de múmias do antigo Egito, comprovam esse fato. Através de estudos realizados por Theodor Bilharz em 1852, foi descoberto um parasito encontrado nos vasos mesentéricos de um camponês autopsiado (Veronesi, 1985). Os gêneros desse parasito foram descritos de forma minuciosa e esse recebeu o nome de *Distomum haematobium*, sendo posteriormente denominado de *Schistosoma haematobium*. Assim, Bilharz foi o primeiro pesquisador a descrever este parasito com riqueza de detalhes, ficando, então, esta doença conhecida como Bilharzia ou Bilharziose (Katz, 2008).

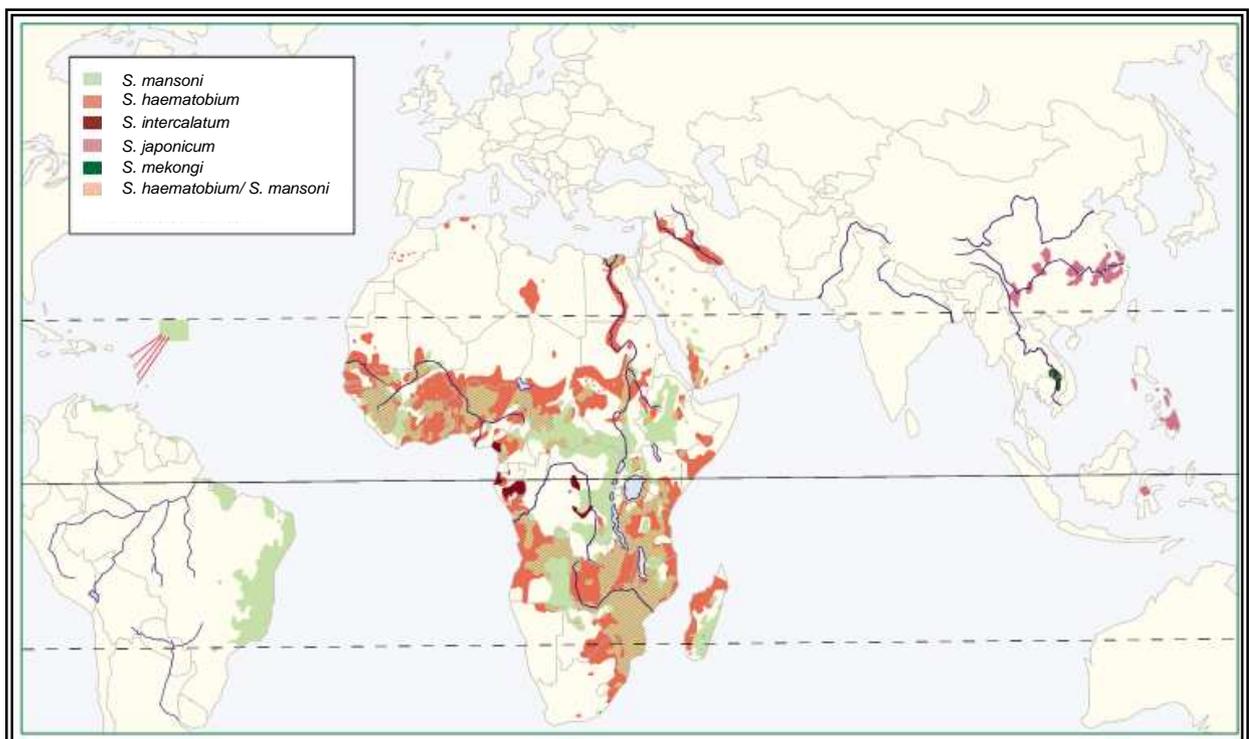
Em 1902, Patrick Manson, através de observações feitas durante o acompanhamento de um paciente inglês que tinha residido nas ilhas do Caribe durante 15 anos, levanta a hipótese da existência de duas espécies diferentes de *Bilharzia*. Ele descreveu uma espécie que eliminava ovos com espículas laterais. Em observações realizadas em outros locais e em março de 1907, durante uma sessão na Zoological Society de Londres, Sambon propõe a criação de uma nova espécie parasita do homem, e em dedicação aos estudos de Patrick Manson denominou o parasito de *Schistosoma mansoni* (Carvalho *et al.*, 2008).

Pirajá da Silva, em estudos realizados em paralelo, descreveu uma possível espécie nova encontrada na Bahia, denominando-a *Schistosoma americanum*. Mas após a publicação de ambos os trabalhos foi visto que se tratava da mesma espécie. A pequena quantidade de vermes estudados por Sambon suscitou dúvidas sobre a validação do seu trabalho, as quais só foram elucidadas com as minuciosas observações de Pirajá da Silva, resultado de uma série de autópsias de casos humanos de onde foram retirados vermes, além de numerosos exames de fezes realizados (Carvalho *et al.*, 2008).

Os trabalhos de Pirajá da Silva descreveram minuciosamente o parasita, confirmando a hipótese de Manson e consubstanciando a espécie identificada por Sambon. Assim, no Brasil, a espécie *S. mansoni* foi descrita pela primeira vez por Pirajá da Silva em

1908, porém, o nome da espécie ainda coube a Sambon. A Faust e colaboradores devem-se o esclarecimento do ciclo evolutivo do verme no organismo do hospedeiro vertebrado (Pessoa & Martins, 1982).

Hoje sabemos que existem muitas espécies pertencentes a este gênero, causando doenças diferentes ao redor do mundo (Figura 1), como: *Schistosoma japonicum*, causador da esquistossomose japônica, ocorre na China, Japão, Indonésia, Filipinas e Tailândia; *Schistosoma haematobium*, causador da esquistossomose hematóbia, vesical ou urinária, ocorre na África, Oriente Próximo e Médio; *Schistosoma intercalatum*, causador de esquistossomose intestinal, típica de países da África Central; *Schistosoma mekongi*, causador de esquistossomose intestinal, comum no vale do Rio Mekong, no Laos e no Camboja; *Schistosoma bovis*, *Schistosoma mattheei*, *Schistosoma rodhaini*, causadores de esquistossomose em animais, eventualmente, acometem o homem na África e *Schistosoma mansoni*, causador de esquistossomose intestinal, única presente no Brasil (Katz & Almeida, 2003).

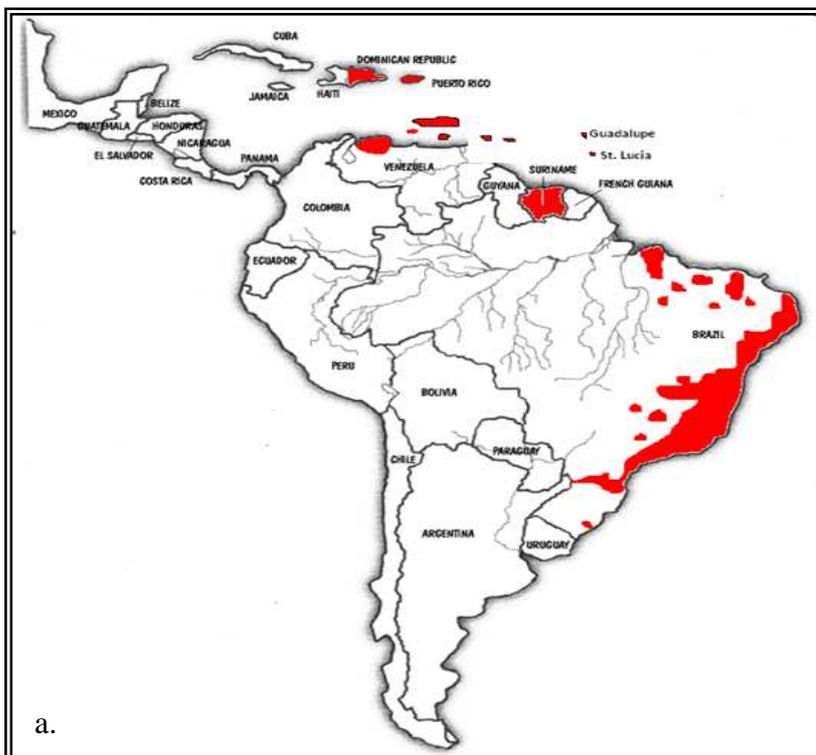


**Figura 1** - Distribuição global das várias espécies de *Schistosoma*.

**Fonte:** GRYSEELS *et al.*, 2006.

Estima-se que cerca de 120 milhões de indivíduos estão infectados e 20 milhões estão em risco de obter infecção pelas diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. Dentre estas espécies, *Schistosoma mansoni* é endêmico em 54 países e territórios na América do Sul,

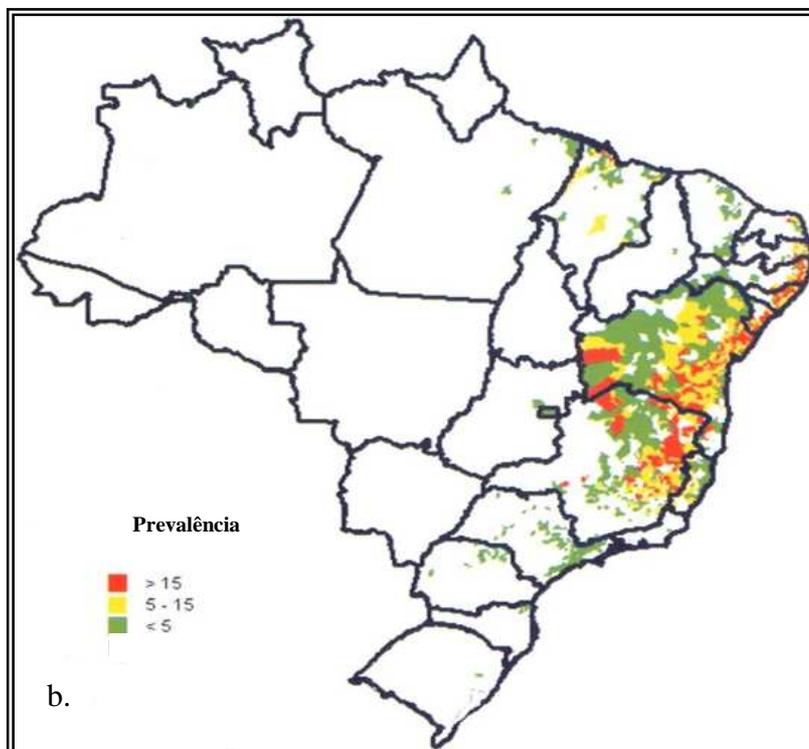
África , Ilhas do Caribe e no Mediterrâneo (Figura 2). Na África, onde 80% dos casos globais estão concentrados, *S. mansoni* é a espécie mais transmitida (Chitsulo *et al.*,2000).



**Figura 2** - Distribuição da esquistossomose:  
a. No Caribe e na América do Sul.

b. No Brasil.

**Fonte:** Adaptado de Programa Nacional de Controle da Esquistossomose, 2008.



A transmissão da doença é hoje reconhecida em importantes áreas metropolitanas do Nordeste do Brasil, no Centro-Oeste da África e na Região Central da China. Tem sido inclusive observado, nessas áreas, que mulheres e crianças correm maior risco de infecção já

que as coleções hídricas são usadas para fins domésticos e recreativos. Quando emigrantes rurais com uma elevada prevalência de esquistossomose vão para uma área peri-urbana, existe um alto risco de transmissão da doença, devido à contaminação dessas coleções de águas naturais (WHO, 2008).

A transmissão da esquistossomose está se espalhando para áreas não endêmicas, tais como os países ocidentais (Houston *et al*, 2004; Bierman *et al*, 2005; Bottieau *et al*, 2006) e o Japão (Kato-Hayash *et al.*,2010).

Determinantes sociais da saúde, ambientais e culturais são conhecidos como fatores-chave na transmissão da esquistossomose. No entanto, nos últimos anos, o controle da doença baseou-se basicamente na distribuição em grande escala da quimioterapia específica. Esta estratégia provisória mostrou-se ser efetiva no controle da morbidade, conseguindo uma redução substancial nas taxas globais da doença. No entanto, é cada vez mais claro que essa abordagem por si só não é capaz de quebrar o ciclo de transmissão em comunidades de alta endemicidade e que a eliminação da esquistossomose depende de estratégias mais complexas e integradas (Curtale *et al.*, 2010).

No Brasil, a transmissão do *S. mansoni* acontece em ambientes hídricos de água com salinidade de até 0,6%, habitados por caramujos planorbídeos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, apesar de evidências experimentais demonstrarem a susceptibilidade de outras espécies de *Biomphalaria*. A presença dessas espécies é essencial para a introdução e manutenção dos focos da esquistossomose mansoni, mas o sucesso da instalação e manutenção desses focos necessita da convergência de uma série de fatores biológicos e ambientais que, conforme a maior ou menor intensidade, determinam as diferentes prevalências e morbidades dessa infecção. Além dos fatores biológicos e ambientais, deficiências do saneamento básico favorecem a transmissão do parasito (Teles, 2005).

Nas últimas décadas tem-se evidenciado a urbanização da doença no Brasil, com o surgimento de casos autóctones nas regiões periurbanas das grandes cidades brasileiras. Este fato está fortemente associado a componentes socioeconômicos e comportamentais das populações dessas localidades (Guimarães & Tavares-Neto, 2006).

No Estado do Ceará têm-se as primeiras notificações da esquistossomose a partir do trabalho científico publicado por Maciel em 1925, no qual encontrou positividade de 2,8% dos 114 marinheiros cearenses estudados; a seguir em 1934, Davis realizando diagnóstico da febre amarela em 7.387 amostras de fígado colhidas no Ceará, encontrou positividade de 0,66% para *S. mansoni*; e também, Evandro Chagas em 1938 realizou

diagnósticos para esquistossomose no município do Crato, sul do Estado. Somente em 1940 foi realizado o primeiro inquérito coproscópico no Estado, por Alencar, que encontrou vários casos autóctones na região do Maciço de Baturité, inclusive na cidade de Redenção, que apresentou positividade de 12,2% , em 199 amostras estudadas (Almeida, 1999).

O município de Maranguape, onde se situa a localidade onde desenvolvemos nosso estudo, no início das ações do Programa Especial de Controle da Esquistossomose – PECE no Ceará, segundo semestre de 1976, pertencia à Região da Bacia Hidrográfica Pacoti-Choró-Pirangi e possuía 283 localidades, destas 278 (98%) foram trabalhadas, apresentando 85 (31%) localidades positivas (Pontes *et al.*, 1999).

Em outro trabalho realizado pelos mesmos pesquisadores, no qual foram avaliados os indicadores epidemiológicos e o impacto das ações de controle sobre a doença, Maranguape apresentou inicialmente coeficiente de prevalência de 2,5%; decaindo 12,5 vezes nos anos seguintes e voltando a aumentar 7,5 vezes no último ano da pesquisa. O número de localidades positivas caiu para 29, porém é importante ressaltar que o número de localidades trabalhadas foi menos de 50% das estudadas inicialmente (Pontes *et al.*, 1999).

Dados do Programa de Controle da Esquistossomose – PCE, que substituiu o PECE a partir de 1979, indicam que até o ano de 2008, Maranguape possuía a localidade com maior índice de positividade para a esquistossomose no Estado, denominada Planalto do Cajueiro, nossa localidade de estudo. Nessa localidade, a prevalência da doença tem aumentado a cada ano. Segundo os últimos levantamentos realizados no local, a prevalência era de 8,53% em 2006, passando para 13,76% em 2007, com aumento de 64% no número de casos positivos em apenas um ano, visto que o número de exames realizados foi aproximadamente o mesmo.

## 1.2. AGENTE ETIOLÓGICO – *Schistosoma mansoni*

Na classificação dos helmintos, o gênero *Schistosoma* encontra-se assim localizado (Olson *et al.*, 2003):

- Filo *Platyhelminthes* Gegenbauer, 1859;
- Classe *Trematoda* Rudolphi, 1808;
- Subclasse *Digenea* Carus, 1863;
- Ordem *Strigeiforme* La Rue, 1926;
- Superfamília *Schistosomatoidea* Stiles e Hassal, 1898;

- Família *Schistosomatidae* Stiles e Hassal, 1898;
- Gênero *Schistosoma* Weiland, 1858.

O *Schistosoma mansoni* Sambon (1907) é um trematódeo digenético que possui formas adultas dióicas, com duas ventosas, tubo digestivo formado inicialmente por esôfago único, o qual em seguida se bifurca para posteriormente se unir em um só ramo terminal, o ceco (Maurer, 2005).

Este parasito é transmitido na África, em algumas ilhas do Caribe, América Central e do Sul. Esta espécie, originária da África, foi introduzida no Brasil na época colonial, através do tráfico de escravos (Files, 1951).

Fatores como a presença de hospedeiros intermediários ideais para a sua adaptação e migrações internas partindo da zona canavieira do nordeste, para o interior e litoral, fizeram com que a esquistossomose mansoni tivesse uma ampla dispersão por todo o território brasileiro (Camargo, 1979).

A linhagem do parasito *Schistosoma mansoni*, que hoje causa o parasitismo em humanos, evoluiu anteriormente em roedores, e da Ásia, migrou para a África e atingiu a região neotropical durante o tráfico de escravos. Sub-populações (cepas) foram selecionadas ao longo deste processo evolutivo, devido ao desenvolvimento do helminto em diversas ordens de vertebrados e espécies de moluscos da família Planorbidae (Martinez *et al.*, 2003).

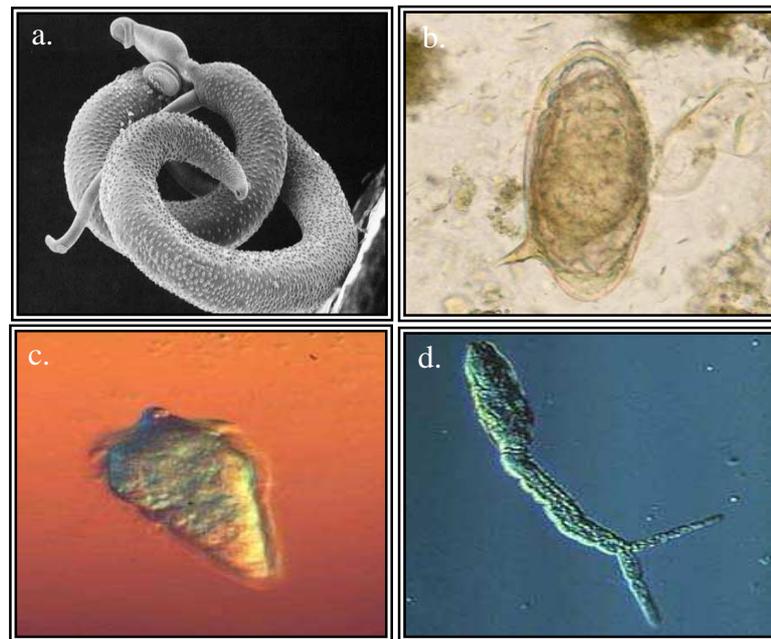
Embora os escravos africanos estivessem infectados por duas espécies de *Schistosoma*: o *S. mansoni* e o *S. haematobium*, apenas o primeiro se desenvolveu no Brasil, pois o ciclo evolutivo do segundo não se instalou nas Américas por falta do hospedeiro intermediário próprio dessa espécie (Katz & Almeida, 2003).

Na Figura 3, observamos ilustrações de formas evolutivas do *S. mansoni*. Valendo ressaltar que o miracídio, é uma larva ciliada, forma infectante para o hospedeiro invertebrado e a cercária, é forma infectante para o hospedeiro vertebrado.

### 1.3. HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

Os hospedeiros intermediários da doença são moluscos do gênero *Biomphalaria*. Preston, 1910 (Mollusca: Pulmonata, *Planorbidae*). Este fato foi descrito inicialmente em 1913 por Miyaki e Suzuki que descreveram também o fato da cercária (larva do *Schistosoma*) transmitir a doença ao homem através da penetração em sua pele. A descrição do ciclo evolutivo das espécies *S. mansoni* e *S. haematobium* foi realizada, pela primeira vez, em

1915, pelo egípcio Leiper. Um ano depois, Adolfo Lutz estudou, no Brasil, a evolução do *S. mansoni* em caramujos da espécie *Biomphalaria olivacea*, atualmente denominada *B. glabrata*. Esses estudos o levaram à descoberta de um novo hospedeiro intermediário, *Biomphalaria straminea* (Carvalho *et al.*, 2008).



**Figura 3** - Formas evolutivas do *S. mansoni*. ; a. casal de verme adulto; b. ovo; c. miracídio; d. cercária.  
**Fonte:** Adaptado de [www.dpd.cdc.gov](http://www.dpd.cdc.gov), OMS/TDR e Arquivos Fiocruz.

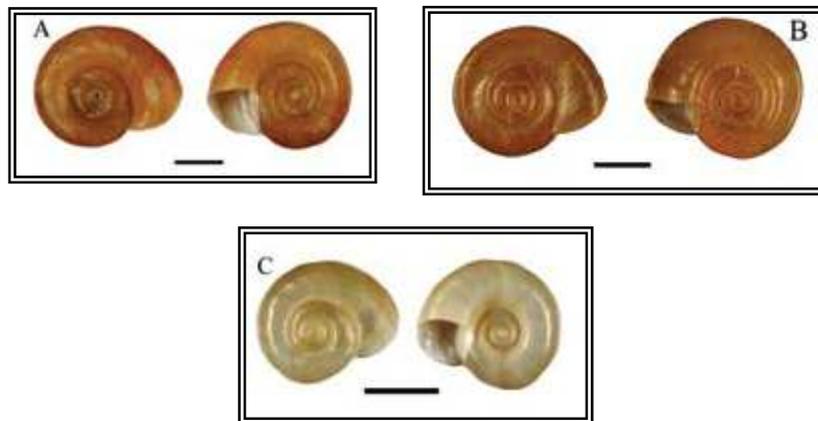
O gênero *Biomphalaria* possui 37 espécies já identificadas na África e na Região Neotropical. No Brasil foram reconhecidas 11 espécies, dentre estas apenas três: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* (Figura 4) são encontradas naturalmente infectadas (Pepe *et al.*, 2006).

O *Biomphalaria glabrata* é considerado o mais eficiente vetor devido a sua alta susceptibilidade a infecção. Por outro lado, o *B. straminea* é altamente resistente a infecção por *S. mansoni*, e biologicamente menos eficiente na produção de cercárias em comparação ao *B. glabrata* (Barbosa, 1992). No entanto, o *B. straminea* é importante na transmissão epidemiológica, devido a sua grande distribuição geográfica, e habilidade para invadir e colonizar fontes de água. Na verdade, estas espécies estão presentes em áreas com alta prevalência de esquistossomose (Favre *et al.*, 1995).

Estes moluscos apresentam concha do tipo discóide, com diâmetro variando de 7 a 40 mm, com uma zona central profunda, chamada umbigo, em ambos os lados da concha.

Apresentam a hemolinfa vermelha, devido à hemoglobina solúvel e tubo renal em “J”. São hemafroditas podendo autofecundar-se, mas preferencialmente realizam fecundação cruzada o que possibilita maior troca de material genético. São animais aquáticos, cujo habitat natural são cursos de água de pouca ou nenhuma correnteza, lagos de pequeno porte, brejos, valetas de irrigação, hortas e outros (Vianey-Liaud & Dussart, 1994).

A identificação dos focos de transmissão de esquistossomose é geralmente realizada através da detecção de focos de água contendo caramujos infectados por *S. mansoni*. A identificação convencional de caramujos infectados é baseada na exposição de caramujos à luz e observação de liberação de cercárias (Melo, 2006).



**Figura 4** - Conchas das espécies de *Biomphalaria*: A) *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); B) *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835); C) *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848).

**Fonte:** Ministério da Saúde, 2007.

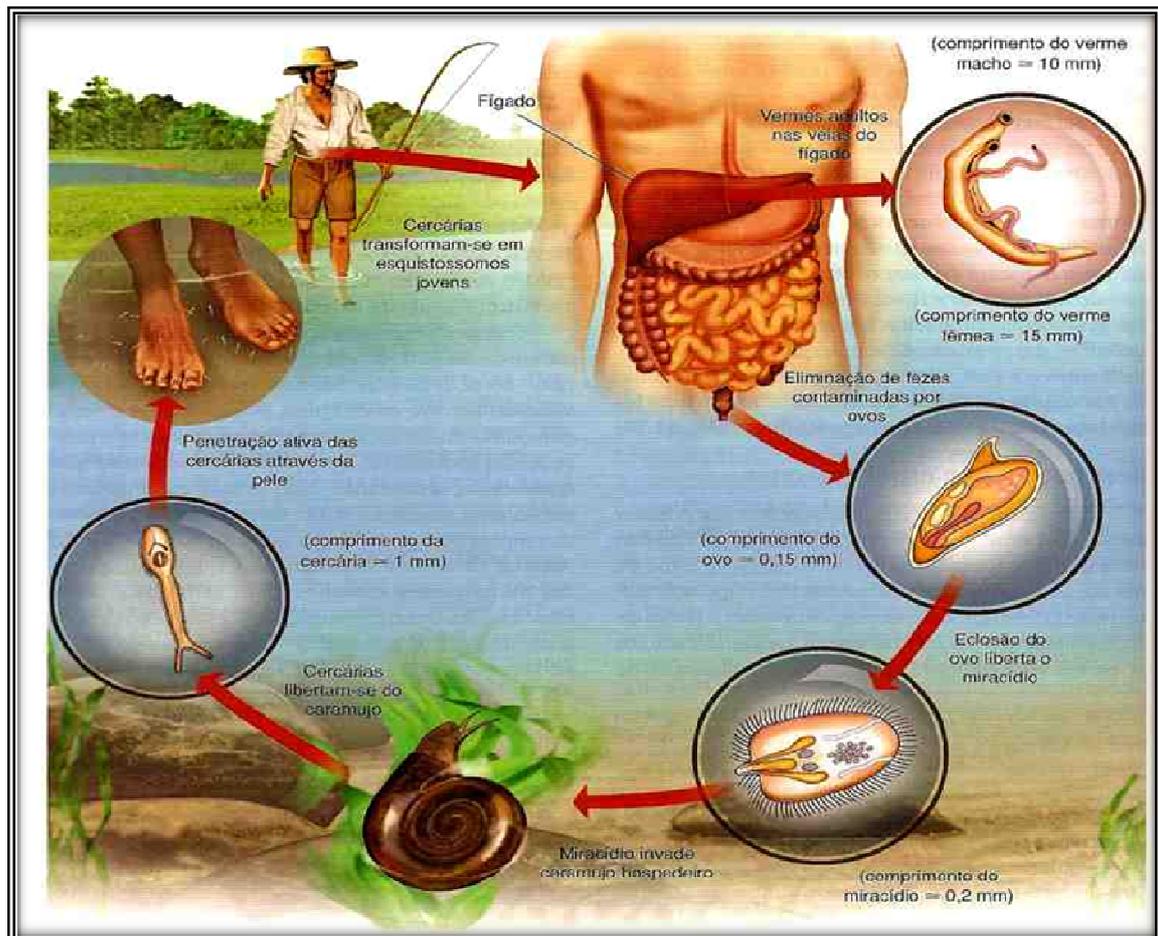
#### 1.4. CICLO DE VIDA DO *S. mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni*, um parasito multicelular, é complexo, pois é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo). Há, ainda, duas formas larvárias de vida livre no meio aquático (miracídio e cercária), que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de cerca de 40 dias. No molusco, o ciclo é assexuado e dura, aproximadamente, 40 dias (Figura 5) (Rey, 2001).

A fêmea do *S. mansoni* produz centenas de ovos por dia, cada ovo contém um miracídio – larva ciliada – que secretam enzimas proteolíticas que ajudam o ovo a migrar para a luz do intestino, com o objetivo de ser eliminado nas fezes, permanecendo viáveis por até 07 dias. Em contato com a água, o ovo libera o miracídio que procura o hospedeiro intermediário, guiado pela luz e por estímulos químicos. Depois de penetrar no caramujo, o miracídio se multiplica assexuadamente em esporocistos multicelulares, que mais tarde darão origem as larvas cercarianas que possuem uma característica cauda bifurcada. As cercárias saem do caramujo 4-6 semanas depois da infecção e nadam livremente na água por até 72 horas procurando um hospedeiro definitivo apropriado. A liberação das cercárias é provocada pela luz e ocorre principalmente durante o período diurno. Um único caramujo infectado, por apenas um miracídio, pode liberar milhares de cercárias todos os dias durante meses (Gryseels *et al.*, 2006).

Na busca por um hospedeiro, as cercárias penetram na pele utilizando a ventosa oral e ventral, migram através da pele intacta para as veias dérmicas e, ao longo dos próximos dias, para a vasculatura pulmonar. Durante esta migração as cercárias sofrem metamorfose perdendo a cauda e desenvolvendo um tegumento heptalaminado. Os organismos, agora chamados esquistossômulos, absorvem uma variedade de proteínas do hospedeiro, incluindo antígenos eritrocíticos (glicopeptídeos na forma de antígenos de grupos sanguíneos), imunoglobulinas, antígenos principais de histocompatibilidade de classe I (MHC – classe I) e componentes do complemento, dentre outras; mascarando seu estado de estranheza perante o reconhecimento imunológico (Carvalho *et al.*, 2008). O seu metabolismo passa a glicólise e os esquistossômulos migram através dos capilares pulmonares para a circulação sistêmica, que os leva para as veias porta, onde se concluirá o amadurecimento sexual e a transformação em vermes adultos. Dentro da vasculatura portal, machos e fêmeas acasalam-se, com a entrada da fêmea no canal ginecóforo do macho (Behrman, 2009).

O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (Miller & Wilson, 1978). A vida de um *Schistosoma* adulto é em média de 3-5 anos, mas pode chegar até 30 anos e o potencial teórico de reprodução de um casal é de até 600 bilhões de vermes (Gryseels *et al.*, 2006).



**Figura 5** - Ciclo de vida *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Melo, 2006.

## 1.5 PATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

Atualmente, a esquistossomose ainda é um problema de saúde pública, no Brasil, amplamente disseminado nas regiões sudeste e nordeste, enquanto nas regiões norte e sul, as áreas endêmicas apresentam-se mais dispersas e isoladas. Ainda que as estimativas sobre o número de pessoas infectadas e sujeitas à infecção sejam um assunto controverso, sempre superam a casa de milhões. Devido ao grande número de pessoas afetadas, e aos constantes deslocamentos da população em busca de melhores condições de vida, os portadores humanos do parasita são diagnosticados em todo o território nacional (Teles, 2005).

Um dos principais motivos para a expansão dessa endemia é a prática do turismo rural e a migração de pessoas infectadas, especialmente para as áreas periféricas dos grandes centros urbanos do país. Fatores sócio-econômicos e sócio-demográficos também são determinantes na transmissão da doença, sendo imprescindível levá-los em consideração antes de decidir-se por qualquer medida de controle (Carvalho *et al.*, 1997).

A esquistossomose mansoni induz diferentes manifestações clínicas nas fases aguda e crônica. Inicia-se com a penetração das cercárias, podendo ser assintomática ou desenvolver uma infecção aguda dentro de poucas horas após a penetração destas na pele, caracterizando-se por lesões maculopapular com intensa manifestação pruriginosa (dermatite cercariana) que perdura, em geral, de 24 a 72 horas, podendo chegar até no máximo 15 dias (Prata, 2002).

A fase aguda ocorre várias semanas após a penetração das cercárias, sendo considerada uma reação alérgica toxêmica à migração e maturação das larvas do *S. mansoni*. Em geral os sintomas são febre, tosse seca, fraqueza, dor de cabeça, sintomas abdominais, urticária e/ou angioedema. A gravidade do quadro clínico varia de acordo com a carga parasitária e a resposta imune aos antígenos do parasito, sendo que imunocomplexos circulantes são encontrados em 55-93% dos pacientes com esquistossomose aguda (Mountford, 2005).

Muitos pacientes não têm uma forma clara de esquistossomose aguda, apresentando-se assintomáticos, ou com poucos sintomas e leves, ou ainda queixas inespecíficas. Esta fase sintomática aguda é descrita principalmente em indivíduos não-imunes expostos à água contaminada em áreas endêmicas (Corachan, 2002).

Manifestações neurológicas, pulmonares e cardíacas podem ocorrer durante a esquistossomose aguda, e algumas podem ser fatais. O envolvimento do cérebro durante esta fase por ser percebida como dor de cabeça, confusão mental, convulsões, perda da consciência, deficiências visual, ataxia, incontinência urinária ou paralisia motora. O envolvimento cardíaco foi demonstrado em um estudo realizado durante um surto no Brasil, por De Jesus *et al.* em 2002, com 31 pacientes dos quais 38,7% (12) apresentavam dor no peito e 19% (06) tinham um diagnóstico positivo na ecografia para pericardite. É de salientar que estas formas mais graves podem ocorrer durante a evolução espontânea da doença ou após o tratamento com praziquantel (Jauréguiberry *et al.*, 2007).

Os sintomas da fase crônica podem apresentar-se meses ou até anos após a exposição principal, sendo resultado da resposta imunológica induzida pelo ovo, com formação de granulomas associado a alterações fibróticas. Este quadro é mais comum do que a forma aguda da doença, visto que as formas cercarianas e adultas do verme são minimamente imunogênicas, enquanto que os ovos são altamente imunogênicos. Durante a evolução da esquistossomose crônica, dependendo da maior ou menor susceptibilidade do indivíduo e da intensidade da infecção, podem ocorrer diversas formas clínicas como intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (Gryseels *et al.*, 2006).

A retenção dos ovos e a formação de granulomas na parede intestinal podem causar diarreia sanguinolenta, cólicas e, eventualmente, polipose colônica inflamatória. Pacientes com grande envolvimento da parede intestinal tem um risco maior de infecção recorrente por *Salmonella* (Prata, 2002).

Os ovos não eliminados, que são levados de volta para a circulação portal, induzem reações granulomatosas no trato portal, levando a severa fibrose periportal e infecções com alta carga parasitária são mais propensas a produzir comprometimento hepático. Embora a função hepatocelular seja poupada, a fibrose periportal pode levar a hipertensão portal com seqüelas em potencial, incluindo esplenomegalia, ascite e hemorragia por varizes de esôfago. Devido a essas complicações os ovos podem atingir a circulação pulmonar e a granulomatose e a fibrose resultante pode levar à hipertensão pulmonar, que possui uma alta taxa de mortalidade. Deposição ectópica de ovos pode levar a síndromes clínicas adicionais, podendo atingir a pele, pulmão, cérebro, medula espinhal, músculo, glândulas supra-renais, órgãos genitais e olhos (Gryseels *et al.*, 2006).

As taxas e a intensidade da infecção sofrem influências dentro de uma população de acordo com seus padrões de contato com a água, da imunidade adquirida e dos fatores comportamentais, profissionais, culturais e religiosos. E em relação à idade, os índices aumentam desde a tenra idade para um pico na faixa etária de 8-15 anos e volta a diminuir nos adultos (Gryseels *et al.*, 2006).

## 1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ESQUISTOSSOMOSE

Rotineiramente, o diagnóstico da esquistossomose é baseado na detecção de ovos do parasito nas fezes. Esta abordagem é relativamente barata, de fácil execução, e fornece informações básicas sobre a prevalência e intensidade de infecção. No entanto, uma limitação conhecida de métodos coproscópicos é a falta de sensibilidade, especialmente nas áreas de baixa endemicidade (Quadro 1) e, entre infecções individuais com carga parasitária baixa (Utzinger *et al.*, 2001).

O método tradicional e mais usual para o diagnóstico da esquistossomose mansoni é a detecção de ovos nas fezes através da observação direta e quantitativa descrita por Kato-Katz (Katz, Chaves & Pelegrino, 1972). Contudo, nas áreas onde a doença é de pouca intensidade, com manifestações leves e pouco específicas, com a maioria dos portadores eliminando menos de 100 ovos do parasito por gramas de fezes, a prevalência real da doença

fica subestimada, quando se emprega somente esse método para diagnosticar a esquistossomose (Dias *et al.*, 1992; Ebrahim *et al.*, 1997; Gryseels & De Vlas, 1996; Alarcon de Noya *et al.*, 1999). Isso ocorre por causa da baixa sensibilidade do método de Kato-Katz, que depende diretamente da quantidade de ovos eliminados pelo portador (Barreto *et al.*, 1990; Engels *et al.*, 1996).

<b>Classificação da comunidade</b>	<b>Prevalência* obtida em inquérito com escolares</b>
I – Alta prevalência	≥ 50% de infectados
II – Moderada prevalência	≥ 10 - < 50% de infectados
III – Baixa prevalência	< 10 % de infectados

**Quadro 1** – Classificação da comunidade segundo a prevalência\* das infecções por Esquistossomose. (\*) obtida por exame de amostras de fezes.

**Fonte:** OMS, 2006.

A probabilidade de se detectar uma infecção com um só casal de vermes por exame de uma só lâmina, pelo método de Kato-Katz, é de aproximadamente 1/24. Esta limitação pode ser superada pelo aumento do número de amostras e também pelo aumento do número de lâminas examinadas por amostra (Rabello *et al.*, 2008; Da Frota *et al.*, 2010).

A fim de superar essa limitação, o exame de uma maior quantidade de fezes é necessário, o que aumenta consideravelmente os custos. A necessidade de sucesso nos programas de controle, diante do aumento do número de viajantes infectados e de migrantes, torna necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para o diagnóstico da infecção pelo *Schistosoma mansoni* (Bergquist *et al.*, 2009).

O diagnóstico laboratorial da doença pode ser realizado através de métodos indiretos, que se baseiam na determinação e identificação de antígenos e anticorpos e determinação de indicadores bioquímicos e patológicos, que estão associados à infecção por *S. mansoni* e, principalmente, por métodos classificados como diretos, que detectam os ovos, por exame parasitológico de fezes e por biópsia retal (Gargioni *et al.*, 2008).

Os métodos indiretos são realizados através de técnicas variadas, tais como: detecção de antígenos circulantes do próprio parasito no soro ou na urina do paciente, através da captura do antígeno em ensaios do tipo “sanduíche” utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais com especificidade para epítopos repetidos dos antígenos; detecção de anticorpos (principalmente das classes IgG ou IgM) contra antígenos (totais ou de frações) circulantes do verme adulto, do ovo ou de cercárias.

Uma vez que foi confirmada a presença de antígenos derivados do esquistossômulo na circulação e secreções do hospedeiro infectado, abriu-se a possibilidade

para o imunodiagnóstico da esquistossomose através da detecção de antígenos circulantes específicos (Deelder *et al.*, 1994; De Jonge *et al.*, 1991). As abordagens para a detecção de antígenos circulantes geralmente envolvem captura do antígeno por anticorpos monoclonais. Dois dos antígenos circulantes mais comumente utilizados envolvem as glicoproteínas CAA e CCA, derivadas do epitélio intestinal dos parasitas (Deelder *et al.*, 1980). Em pacientes com esquistossomose mansoni, a sensibilidade de um teste baseado em ELISA de captura do CAA é similar a uma única contagem de ovos nas fezes (De Jonge *et al.*, 1988), sendo o limiar mínimo de detecção equivalente a 10 ovos por grama de fezes. A presença de antígenos circulantes derivados do parasita é indicativo de infecção ativa (De Clerq *et al.*, 1997).

No que diz respeito às avaliações baseadas na identificação de anticorpos, vale ressaltar que essas não indicam obrigatoriamente infecção ativa, pois os anticorpos circulantes permanecem após a cura da infecção, assim o resultado das provas imunológicas pode permanecer positivo durante anos depois da cura (CVE-SP, 2009).

Atualmente tem se intensificado a padronização de técnicas para identificação de DNA circulante de *S. mansoni* onde se pode detectar a infecção um dia após a entrada do parasito (Kato-Hayashi *et al.*, 2010 e Sulbaran *et al.*, 2010).

Nos métodos diretos, quando a carga parasitária é de intensidade moderada (100-399opg) a alta ( $\geq 400$  opg), todas as técnicas parasitológicas apresentam resultado satisfatório. Entretanto podemos observar que a maioria dos métodos atualmente utilizados tem grande dificuldade na identificação de pacientes com baixa carga parasitária (Pinheiro, 2010).

Os exames parasitológicos de fezes podem ser realizados através de vários métodos, desde os mais clássicos, Método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972), até técnicas mais atuais e, ainda, alguns que estão em fase de validação, tais como: Método Helmintex®, (Teixeira *et al.*, 2007), Método de eclosão (Jurberg *et al.*, 2008), Método Gradiente Salínico (Coelho *et al.*, 2009).

O Helmintex® tem como principal característica a identificação de ovos de *S. mansoni* em grandes quantidades de fezes (30 gramas), que são processadas através de uma seqüência de sedimentação espontânea, tamisação e eliminação de detritos e gordura, para posterior isolamento dos ovos através da interação com esferas paramagnéticas e exame microscópico. Em uma aplicação preliminar do Helmintex® para investigar o estabelecimento recente de focos no sudeste do Brasil, aproximadamente três vezes mais ovos foram detectados por esse método quando comparado ao método de Kato-Katz (Teixeira *et al.*, 2007).

O Método do Gradiente Salínico (batizado de “aranha”) consiste de um dispositivo simples baseado em um gradiente salínico para a detecção de ovos por exame microscópico. Sabidamente, soluções de diferentes concentrações salínicas criam uma sedimentação diferencial entre os ovos de *S. mansoni* e homogeneizados de tecidos ou fezes, assim os ovos permanecem na parte inferior do dispositivo, enquanto que os restos de baixa densidade são suspensos para o topo da coluna de gradiente (Coelho *et al.*, 2009);

Estas técnicas parasitológicas variam consideravelmente quanto à sensibilidade, dependendo da quantidade de fezes examinadas, do número de ovos excretados e de fatores inerentes à perda intrínseca durante a realização do procedimento. O que gera uma dificuldade do diagnóstico por meio de um único exame de fezes, principalmente em inquéritos epidemiológicos e mesmo no diagnóstico individual de pacientes (Gargioni *et al.*, 2008).

A biópsia retal é um outro teste bastante sensível e específico, que permite a visualização dos ovos em uma amostra do reto ou do cólon extraída do paciente, mas que por ser um exame invasivo não é recomendado na rotina (CVE-SP, 2009). Seu uso no Brasil se limita aos casos com repetidos exames parasitológicos negativos, enquanto que nos Estados Unidos, onde a esquistossomose é rara, a maioria dos casos são diagnosticados por este método (Behrman, 2008).

Os testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos, também podem ser empregados para o diagnóstico da esquistossomose (Feldmeier *et al.*, 1983 & Doenhoff *et al.*, 2004), todavia esses métodos parecem ter baixa sensibilidade, apresentarem falso-positivos devido à reação cruzada com outros parasitos e não conseguem fazer distinção entre infecções ativas e passadas, o que é particularmente importante em áreas endêmicas.

Além disso, estas técnicas exigem coleta de sangue, um procedimento invasivo, que necessita de centrifugação para obtenção de soro em campo e necessidade de transporte refrigerado para o laboratório, o que dificulta mais ainda sua aplicação em larga escala (Gryseels *et al.*, 2006). É importante relatar que um estudo realizado por Garcia *et al.*, 1995, descreveu a detecção de anticorpos IgG contra antígenos de ovos de *S. mansoni* na saliva e no transudato oral de pacientes infectados, com sensibilidade e especificidade semelhantes que aos obtidos com utilização de soro. Mesmo assim, ainda, permanece como área de interesse o desenvolvimento de técnicas com a utilização de amostras biológicas de fácil obtenção, como saliva ou sangue total de punção de polpa digital em papel filtro (Vaz, 2001).

Métodos moleculares baseados em detecção de DNA foram desenvolvidos para a detecção de parasitos, buscando solucionar alguns dos problemas encontrados com a utilização dos métodos convencionais que são baseados na microscopia para diagnóstico de

parasitos (Singh,1997). O diagnóstico baseado na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) têm demonstrado alta sensibilidade e especificidade, e pode ser utilizado para detecção de DNA de *S. mansoni* em fezes, (Pontes *et al.*,2002) soro (Ten Hove *et al.*,2008) e, recentemente, em plasma (Wichmann *et al.*, 2009) e na urina (Sandoval *et al.*,2006).

## **1.7. TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE APLICADA A ESQUISTOSSOMOSE**

O *S. mansoni* possui características vistas como vantajosas e que facilitam o estudo do seu genoma, como: pequeno genoma, em relação a outros organismos, diploidia, com cromossomos sexuais bem diferenciados, Z e W e adaptação biológica para escapar ou modular o sistema imune do hospedeiro definitivo (Butterworth *et al.*, 1998). Além disso, tanto o polimorfismo nos genes de *Schistosoma* (Tanaka *et al.*, 1994), quanto sua estrutura cromossômica são razoavelmente limitados, o que facilita a análise filogenética (McManus *et al.*, 1993).

O estudo detalhado do genoma deste organismo, iniciado em 1992, empregou uma abordagem baseada na geração de Etiquetas de Sequências Transcritas (ESTs) (Franco *et al.*, 2000). Foram geradas 163.000 ESTs, a partir de diferentes bibliotecas. Após o tratamento dos dados obtidos das leituras de seqüenciamento, 30.988 associações de ESTs foram geradas, o que representou uma cobertura de aproximadamente 92% do transcriptoma do *S. mansoni* (Verjovski *et al.*,2003).

Os surgimentos de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes têm intensificado a necessidade de modalidades diagnósticas mais rápidas e sensíveis (Ehrlich & Greenberg, 1994). Com a aquisição de conhecimento sobre o genoma do *S. mansoni*, os pesquisadores buscam encontrar genes candidatos que satisfaçam os requisitos para a produção de vacinas e medicamentos eficazes e de baixo custo contra a esquistossomose, bem como favorecer o desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico desta doença, que sejam efetivos.

Vários métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção de patógenos infecciosos, visando superar as dificuldades encontradas nos métodos convencionais. Isso foi contornado com a utilização de um método capaz de amplificar milhões de vezes uma molécula de DNA alvo, a técnica de PCR (Mullis & Fallona, 1987). Apesar dos princípios da técnica de PCR terem sido conceitualmente descritos já em 1971 (Kleppe *et al.*, 1971), os

primeiros dados experimentais só foram publicados em meados dos anos 80 (Saiki *et al.*, 1985). No início, a abordagem existente era lenta, cara e imprecisa (Gelfand, 1989).

Em 1988, Saiki e colaboradores descreveram o uso da DNA polimerase extraída da bactéria termófila *Thermus aquaticus* na PCR. O uso dessa enzima termoestável simplificou de forma extrema o procedimento e, permitiu que a reação fosse processada em temperaturas mais altas, já que a temperatura ótima de reação da enzima passou de 37° C para 72° C, elevando a estringência da reação (Erlich, 1991; Innis & Gelfand, 1990).

A PCR é uma técnica da biologia molecular que tem um grande potencial para a análise genética de tecidos. Isso inclui diagnóstico pré-natal rápido de doenças hereditárias, detecção de doença residual, detecção de clonalidade em lesões linfoproliferativas, identificação de mutações pontuais em protooncogenes celulares, diagnóstico de infecções virais, detecção de DNA de plasmódio e de *S. mansoni* (Abath *et al.*, 2002), e de muitos outros patógenos infecciosos como: *Helicobacter pilory* (Lage *et al.*,1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Tan *et al.*, 1999), *Toxoplasma gondii* (Eisenstein, 1990), *Entamoeba histolytica* (Pinheiro *et al.*, 2004), *Streptococcus* sp. (Chesky *et al.*,1998).

A técnica de PCR tem sido utilizada na abordagem clínica de uma grande variedade de infecções patogênicas, tais como: o vírus da imunodeficiência humana (Dias Neto *et al.*,1996), *Legionella pneumophila* (Starnbach *et al.*,1990), *Plasmodium falciparum* (Wooden *et al.*,1993) e *Trypanosoma cruzi* (Russomando *et al.*,1992). No estudo de *Schistosoma* sp., também tem sido utilizada com sucesso para a determinação do sexo das cercárias (Gasser *et al.*,1991), para a clonagem e sequenciamento de genes específicos (Kiang *et al.*,1996) e na determinação da variabilidade genética de cepas e espécies de *Schistosoma* sp. (Simpson *et al.*,1995).

De acordo com estudo realizado por Abbasi *et al.*,2003, utilizando a PCR foi possível detectar em amostras de fezes (coprodiagnóstico) DNA de *Echinococcus granulosus*, fazendo sua diferenciação da espécie *E. multilocularis*, bem como detectar uma variedade de espécies de *Taenia* sp. Determinou-se uma maior sensibilidade e especificidade da PCR em relação aos métodos de detecção de copro-antígenos. A eficiência da PCR utilizando DNA extraído de fezes, também foi demonstrada por Zaki *et al.*,2003., que utilizando a PCR, fizeram diferenciação de cepas de *Entamoeba histolytica*.

Diante disso, a técnica molecular baseada na PCR vem sendo cogitada como mais uma alternativa de diagnóstico da esquistossomose mansoni. Algumas poucas abordagens baseadas na detecção de DNA específico de *Schistosoma* foram descritas para a detecção desse parasito em moluscos (Hanelt *et al.*, 1997; Janotti-Passos *et al.*, 1997), na identificação

de águas contaminadas com cercárias (Hamburger *et al.*, 1998), e na detecção em fezes humanas (Pontes *et al.*, 2002). É importante destacar que o DNA do parasito já foi detectado, experimentalmente, na urina e soro de camundongos infectados com uma e duas semanas pós-infecção, respectivamente (Sandoval *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006).

O sequenciamento completo do genoma mitocondrial de *S. mansoni* foi essencial para o desenho de primers aplicáveis aos testes baseados em PCR, para a detecção específica e sensível do ovo deste parasito, no material fecal de hospedeiros infectados (Le *et al.*, 2000).

Para o desenvolvimento da PCR utiliza-se como alvo o DNA ribossomal (rDNA) do *S. mansoni*. Este alvo está presente em cerca de 100 cópias por genoma. É um complexo de aproximadamente 10 kb, compreendendo os genes que codificam a subunidade pequena do RNA ribossomal (Johnston *et al.*, 1993). O rDNA apresenta regiões conservadas e variáveis entre espécies. Hamburger *et al.*, 1998, desenvolveram um protocolo de PCR baseado na amplificação de uma sequência de DNA altamente repetitiva do parasito para monitoramento de infecção de *S. mansoni* em água.

Apesar de técnicas baseadas em PCR terem sido amplamente relatadas para o diagnóstico de vários patógenos infectantes, as aplicações para detecção de *S. mansoni* têm sido escassas. Poucos estudos foram publicados sobre a detecção de DNA do parasito em caramujos (Jannotti-Passos *et al.*, 1997). A utilização da PCR para identificação de focos de transmissão (Hanelt *et al.*, 1997) ainda não foi devidamente validada para uso em larga escala em áreas endêmicas. É importante destacar que a identificação sensível e precisa dos locais de transmissão de esquistossomose, pela detecção da infecção no caramujo vetor é de grande importância para o controle da doença (Gomes *et al.*, 2009).

Embora a PCR tenha sido extensivamente utilizada para o diagnóstico de diversas doenças humanas, sua aplicação para as doenças negligenciadas, especialmente a esquistossomose, só recentemente tem sido explorada. No estudo realizado por Pontes *et al.*, 2002, foi descrito, pela primeira vez, a utilização da PCR para a detecção de DNA de *S. mansoni* em amostras humanas de fezes e soro, sendo possível detectar até 1 fentograma de DNA. Para avaliar a sensibilidade da PCR, o DNA de ovos de *S. mansoni* foi quantificado e testado por amplificação, após diluições seriadas.

Nesse mesmo estudo, a especificidade da PCR na amplificação de DNA de *Schistosoma mansoni*, em amostras de fezes, foi avaliada por meio de quantidades iguais de DNA de outros parasitos relacionados sob as mesmas condições de reação; DNA de *S. mansoni* foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Não observou-se nenhuma amplificação de DNA por qualquer dos outros parasitos

helmínticos avaliados. A proporção de positividade observada pela técnica de PCR nesse estudo, foi de 61,2%, tendo sido avaliados 67 habitantes provenientes de uma área endêmica para esquistossomose, no Brasil. Com esses resultados, a PCR se mostrou 10 vezes mais sensível que a técnica de Kato-Katz.

Concomitantemente, nesse mesmo estudo, foi sugerido a possibilidade de detecção de DNA de *S. mansoni* em soros de pacientes com esquistossomose. No entanto, o número de amostras positivas detectadas foi muito pequeno, assim, ainda não ficou demonstrado se existe DNA de *S. mansoni* suficiente neste tipo de amostra clínica, para torná-la útil para a detecção por PCR.

Posteriormente, esses pesquisadores empregaram a PCR para o diagnóstico em moradores de uma área endêmica para esquistossomose, localizada em Comercinho, Minas Gerais (Pontes *et al.* 2003). Nesse estudo, a prevalência determinada pela PCR, utilizando apenas uma amostra fecal, foi 38,1%, enquanto a prevalência detectada pela coproscopia, realizada com utilização de três amostras fecais, foi de 30,9%. Verificou-se que a técnica de PCR mostrou uma sensibilidade de 96,7% e uma especificidade de 88% quando o exame parasitológico de fezes foi utilizado como teste de referência.

Sandoval *et al.*, 2006, em estudo realizado na Salamanca- Espanha, com amostras de fezes e urina demonstraram que pela técnica de PCR também é possível determinar a espécie de *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* ou *S. bovis*).

Concomitantemente, com os avanços no emprego e na realização da PCR, os métodos de extração de DNA também passaram por um processo de aprimoramento, melhorias e adequações, de forma a serem empregados nos mais diferentes tipos de fontes de DNA potenciais, ampliando o campo de utilização da PCR.

Um dos fatores limitantes para a utilização da PCR em amostras clínicas é a presença de substâncias que inibem ou reduzem a eficiência da amplificação como sais biliares nas fezes, o grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteinases no leite e uréia na urina. Entre os inibidores que geralmente são introduzidos no processo de coleta ou extração do material biológico estão: fenol e clorofórmio (inibidores da ação enzimática); proteinase-K (degrada a DNA polimerase); EDTA, heparina (quelantes dos íons  $MgCl_2$ ) (Sambrook *et al.*, 1989).

A presença de substâncias inibidoras em amostras biológicas complexas, podem interferir na PCR por causar lise celular, inativar a DNA polimerase, e / ou interferir na estrutura dos ácidos nucleicos (Powell *et al.*, 1994 ; Wilson *et al.*, 1997; Abu Al-Soud *et al.*,

2000). A presença de altas concentrações de substâncias inibidoras da PCR em amostras de fezes, limita a utilização direta das fezes como DNA-molde (Feder *et al.*, 2001), e por este motivo diferentes técnicas precisam ser empregadas para diminuir a inibição da PCR.

Muitos métodos têm sido descritos para a remoção ou inativação de inibidores da PCR em amostras fecais. O método de extração convencional do fenol-clorofórmio parece ser o mais comumente utilizado (Kuhl, *et al.*, 1993). Esse é o método clássico para a preparação de amostras de fezes para a PCR sendo responsável pela eliminação dos contaminantes biológicos em suspensões fecais, mas parecendo ser incapaz de remover substâncias inibidoras não-biológicas (Stacy-Phipps *et al.*, 1995). Vale ressaltar que existem disponíveis Kits comerciais para preparação de amostras de fezes para a PCR (Xu *et al.*, 1995), sendo importante levar em consideração o custo/benefício desses.

Recentemente, Allam *et al.*, 2009, aplicando a técnica de PCR em amostras de fezes de indivíduos de área de baixa endemicidade demonstraram que a PCR é mais sensível que o exame parasitológico, entretanto, alguns casos com exame de fezes positivo não foram detectados pela PCR. Essa discrepância pode ser devido ao método de extração do DNA da amostra clínica. Já está bem estabelecido que amostras de fezes possuem substâncias que podem inibir enzima utilizada na reação da PCR, o que pode acarretar resultados falso negativos.

É importante ressaltar que a utilização da técnica de PCR para detecção de DNA específico de *Schistosoma* (Halnet *et al.*, 1997; Janotti-Passos *et al.*, 1997) já foi utilizada na identificação do parasito em águas contaminadas com caramujos infectados e fezes (Hamburger *et al.*, 1998; Pontes *et al.*, 2002), bem como na detecção de cercárias em amostra de plâncton (Hertel *et al.*, 2003), e em fezes humanas (Pontes *et al.*, 2002). Sendo assim, o emprego de novas abordagens diagnósticas bastante sensíveis e específicas, baseadas em PCR, pode ser potencialmente útil para a detecção do parasito em caramujos, no hospedeiro vertebrado e águas contaminadas, contribuindo para o sucesso do controle da esquistossomose.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico da esquistossomose mansoni, em indivíduos provenientes de uma área de baixa endemicidade no Município de Maranguape no Estado do Ceará, em comparação com outros métodos de diagnóstico.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Pesquisar os anticorpos IgG total, anti- *Schistosoma mansoni*, através do método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) em amostras de soro dos indivíduos da localidade Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE;
2. Realizar métodos coproscópicos para detecção direta do *S. mansoni* e de outros parasitos, em amostras de fezes de indivíduos da localidade Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE;
3. Empregar a técnica de PCR convencional para detecção de fragmentos de DNA de *S. mansoni* em amostras de fezes, provenientes de indivíduos da localidade Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE, comparando os resultados da PCR com os métodos coproscópico e sorológico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo, longitudinal. O período do estudo foi de Janeiro a Setembro de 2010.

Este estudo foi desenvolvido em cinco etapas:

1ª Etapa: Divulgação do projeto junto aos residentes da localidade e visita domiciliar para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido;

2ª Etapa: Realização da coleta de sangue no posto de saúde, na data previamente agendada com a comunidade;

3ª Etapa: Distribuição dos frascos para coleta de fezes e após 24 horas recolhimento;

4ª Etapa: Realização dos métodos de diagnóstico sorológico e coproscópico;

5ª Etapa: Seleção da amostragem e realização do método de diagnóstico molecular, a PCR.

#### 3.2. ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

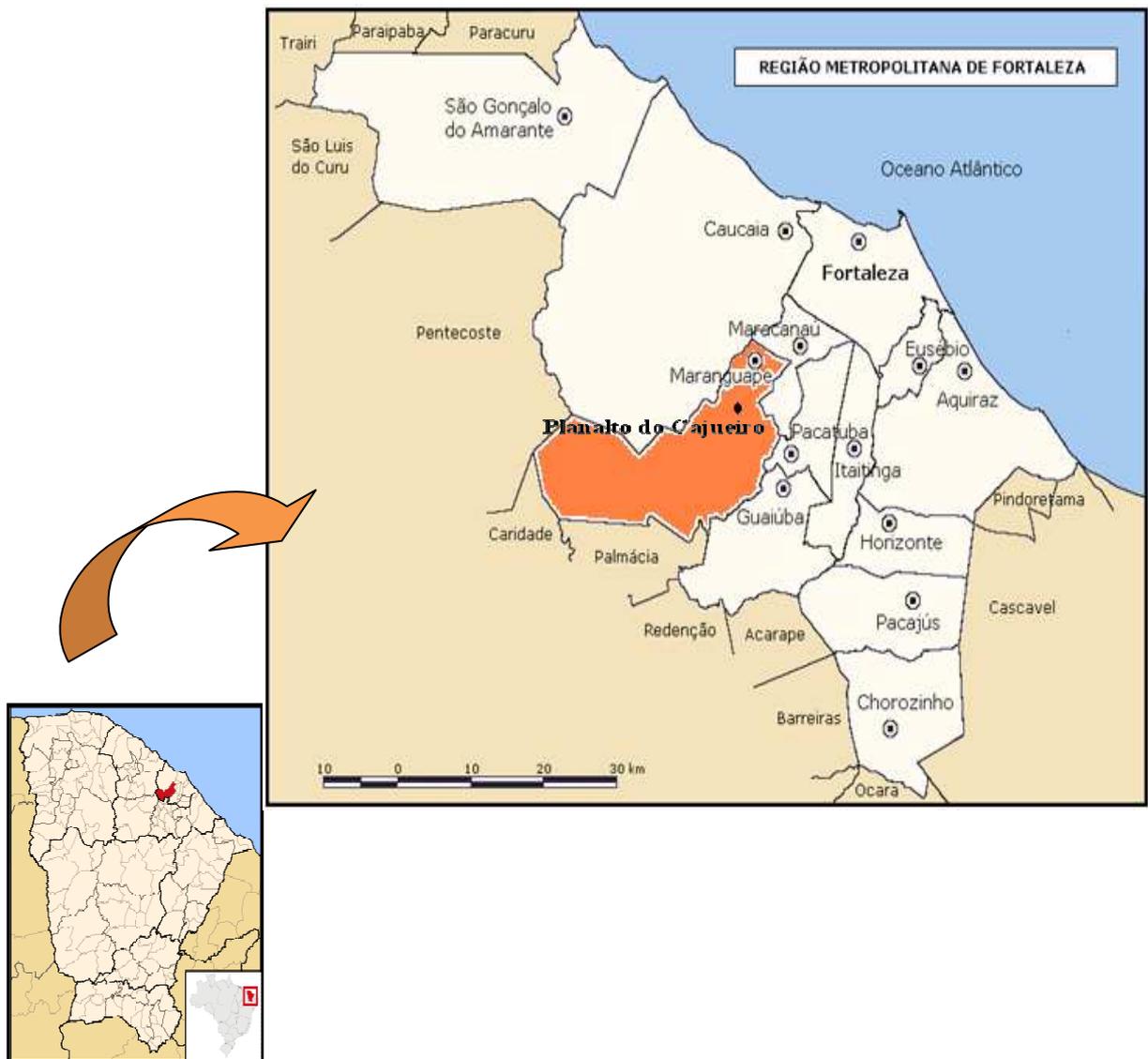
Este estudo foi realizado na localidade Planalto do Cajueiro no Município de Maranguape (Figuras 6 e 7). Esse se localiza no sopé da serra, a 68,57 m de altitude e situa-se a 30 km de Fortaleza. Com área de 654,8m<sup>2</sup> conta com uma população estimada de 98.429 habitantes. O Planalto do Cajueiro possui uma população estimada de 903 habitantes.

Os moradores desta localidade têm sua fonte de renda baseada, principalmente, na agricultura de subsistência, como também em algumas indústrias têxteis e de calçados que se instalaram no município. A população está situada em locais de risco para transmissão de doenças (como esquistossomose, leishmaniose, dengue, entre outras), devido às precárias condições de infra-estrutura e saneamento.

**Critérios de inclusão:** Foram incluídos no estudo os indivíduos da localidade acima mencionada, com idade superior a 02 anos, de ambos os sexos, que concordaram em participar do projeto mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido

(Apêndice I). No caso dos indivíduos menores de idade, a autorização na participação da pesquisa ficou a cargo dos pais ou do responsável pelas crianças.

Concordaram em participar do projeto, no qual esse estudo está inserido, 250 indivíduos, dos quais 125 realizaram coleta de sangue e de material fecal.



**Figura 6** - Localização do município de Maranguape e da área de estudo.  
**Fonte:** Adaptado de IPECE (2007).



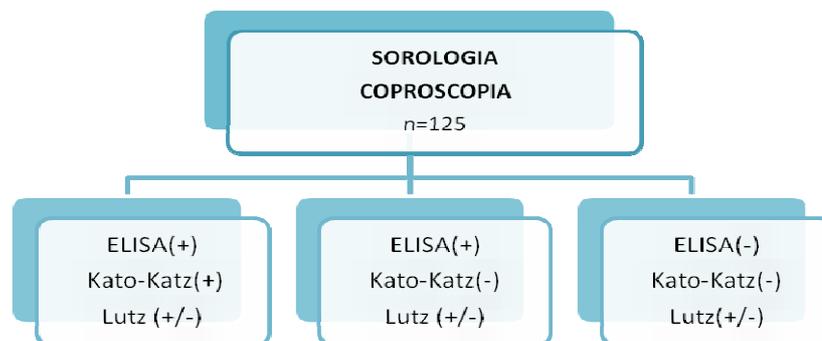
**Figura 7** - Fotos da localidade do Planalto do Cajueiro - Maranguape – CE.  
**Fonte:** Arquivos do LPPBM.

### 3.3. AMOSTRAGEM

#### 3.3.1 Grupos de estudo

##### 3.3.1.1 Grupo A- Sorologia e Coproscopia

Esse grupo é composto pelos 125 indivíduos que realizaram coleta de sangue e de material fecal, com quantidade suficiente para realização das técnicas coproscópicas propostas. Abaixo segue um fluxograma formado para análise dos resultados.



**Figura 8** - Amostragem total testada pelas técnicas sorológica e coproscópicas.

**Fonte:** Elaboração da autora, 2010.

##### 3.3.1.2 Grupo B– Sorologia, Coproscopia e PCR.

Esse grupo foi composto de 56 dos 125 indivíduos do Grupo A. Conforme os resultados obtidos na coproscopia e sorologia, as 56 amostras fecais desses indivíduos foram distribuídas em cinco grupos (Figura 9).

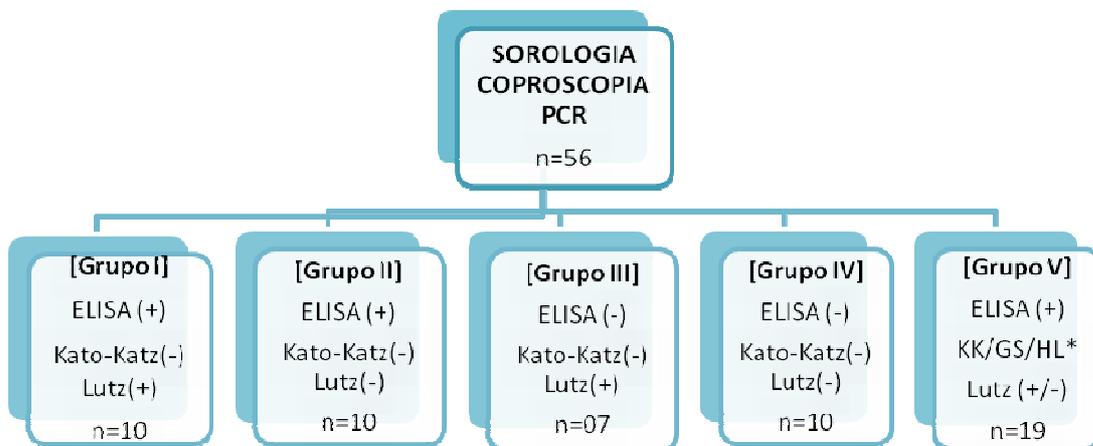
[Grupo I]: 10 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA reativo, mas sem confirmação parasitológica da esquistossomose e com coproscopia positiva para outras parasitoses.

[Grupo II]: 10 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA reativo, mas sem confirmação parasitológica da esquistossomose e com coproscopia negativa para outras parasitoses.

[Grupo III]: 07 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA não reativo, com resultados negativos na coproscopia para esquistossomose, mas com coproscopia positiva para outras parasitoses.

[Grupo IV]: 10 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA não reativo, com resultados negativos na coproscopia para esquistossomose e com coproscopia negativa para outras parasitoses.

[Grupo V]: 19 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA reativo, com presença de ovos de *S.mansoni*. Número total de indivíduos com coproscopia positiva para *S. mansoni*.



\*KK = Kato-Katz ; GS= Gradiente Salínico ; HL= Helmintex®

**Figura 9** - Formação dos cinco grupos testados pela técnica molecular de PCR.

**Fonte:** Elaboração da autora, 2010.

No grupo V foram acrescentadas amostras diagnosticadas pelos métodos coproscópicos de Gradiente Salínico (Coelho *et al.*, 2009) e Helmintex® (Teixeira *et al.*, 2007). Esses dados foram obtidos por Pinheiro, M.C.C., (2010), fazem parte de análises realizadas pelo nosso grupo, em outra etapa da pesquisa a qual esse estudo está vinculado.

### **3.3.2 Amostras controles**

Utilizamos DNA obtido de amostra clínica com a presença do parasito pela PCR, como controle positivo e DNA de amostra negativa para qualquer parasitose de indivíduo de área não endêmica, como controle negativo.

## **3.4. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO**

### **3.4.1. Coleta de sangue**

A divulgação do dia para a coleta de sangue foi realizada pelos agentes de saúde que atendem a comunidade, em visitas domiciliares aos indivíduos participantes da pesquisa.

A coleta foi realizada no posto de saúde da localidade, com a participação de técnicas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Municipal de Maranguape.

Foram coletados 5 ml de sangue, por punção venosa, utilizando material a vácuo esterilizado e descartável. O soro foi separado por centrifugação, alíquotado, identificado e transportado sob refrigeração para o LPPBM (Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos) da UFC. As amostras sorológicas foram armazenadas em freezer, a menos 70°C, para posteriores análises pelo método ELISA.

### **3.4.2. Coleta de fezes**

Foram distribuídos, na casa dos participantes da pesquisa, frascos de coleta (coletor universal) com tampa e espátula, identificados com nome e número, específicos para cada indivíduo. Decorridas 24 horas, os frascos foram recolhidos e levados ao LPPBM, onde foi preparado o método de Kato-Katz (03 lâminas), o método de Hoffmann e armazenou-se uma alíquota de um grama em freezer, a menos 20°C, para posterior realização da técnica de PCR.

Para a coleta do material fecal contamos com a participação de técnicos da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) lotados na localidade, que participaram tanto na distribuição dos frascos coletores, quanto no recolhimento dos mesmos. Após a realização dos exames de fezes, o restante do material foi descartado em sacos plásticos e levado para incineração junto ao lixo biológico do Hospital Universitário Walter Cantídio /UFC.

### 3.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Foram realizados três tipos de métodos de diagnóstico: sorológico, coproscópico e molecular.

#### 3.5.1 Método Sorológico - Técnica de ELISA (Colley *et al.*, 1977)

As amostras de soro foram submetidas à reação imunoenzimática de ELISA para determinação de anticorpos IgG para esquistossomose, de acordo com protocolo de Colley *et al.*, 1977, com modificações.

Foram utilizadas placas de 96 poços Maxisorp (NUNC<sup>®</sup>), sendo sensibilizadas pela adição, a cada poço, de 100 µL do antígeno total de verme adulto de *S. mansoni* (fornecido pelo Prof. Dr. Alfredo Góes, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais), na concentração de 5µg/mL de proteínas em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Foi escolhido este tipo de antígeno por proporcionar uma boa sensibilidade para este teste. As placas foram seladas e mantidas a 4°C por 18 horas. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de NaCl 0,05M, contendo 0,05% de Tween 20 e secas. Foram adicionados a cada poço 100µL de soro de cada amostra a ser testada, em duplicata, diluídos em 1:200 em solução diluente (tampão fosfato salino (PBS), contendo NaCl 0,5M, pH 7,2 e 0,2% de Tween 20) . As placas foram seladas e incubadas por 1 hora e 30 minutos em estufa a 37°C. Após esse período, as placas foram novamente lavadas três vezes e secas. Foram adicionados 100µL de Anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich) por poço, diluído 1:1.500 em solução diluente. As placas foram seladas e incubadas novamente por mais uma hora e meia em estufa a 37°C.

Após 3 lavagens, as placas foram secas e adicionou-se, por poço, 100µL de ortofenildiamina - OPD (Sigma-Aldrich) diluído em tampão citrato/fosfato 0,1M, pH 5,0 e 0,03% de peróxido de hidrogênio. As placas foram então incubadas ao abrigo da luz por 20 minutos, a temperatura ambiente e depois a reação foi interrompida com a adição de 20µL / poço de ácido sulfúrico 2N.

A densidade ótica foi medida em leitor automático de ELISA (BioTeck<sup>®</sup>), utilizando um filtro de 490nm.

Foram consideradas positivas as reações com densidade óptica (DO) acima de 0,283, que foi o valor do “cut-off” determinado utilizando-se a média mais dois desvios

padrões da leitura em DO obtida de 35 soros de um grupo controle, formado por indivíduos não provenientes de região endêmica para a esquistossomose.

### 3.5.2. Métodos Coproscópicos

#### 3.5.2.1. Método de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972)

Este método foi realizado utilizando o Kit Helm-Test<sup>®</sup>, onde foi colocada sobre as fezes uma tela, fornecida pelo kit, pressionando-as com o auxílio de uma espátula. Utilizando a espátula, foi colhida uma pequena quantidade (40 a 50mg) das fezes que passaram pela tela, depositando no orifício do cartão, que estava sobre uma lâmina. Após preencher completamente o orifício, o cartão foi retirado, deixando as fezes sobre a lâmina de vidro. As fezes foram cobertas com lamínula de celofane, previamente embebida em solução de verde-malaquita, a lâmina foi invertida em uma superfície lisa, pressionando-a para a formação de uma camada delgada entre lâmina e lamínula (Figura 10). Foram levadas para estufa a 40°C por 2 horas, em seguida foi realizada a leitura das mesmas ao microscópio, percorrendo toda a superfície delimitada pela lamínula, fazendo a contagem do número de ovos de *S. mansoni*. O número de ovos encontrados foi multiplicado pelo fator de conversão (24), o que corresponderá ao número de ovos por grama de fezes (a quantidade de fezes contida no volume que passa pelo orifício é de aproximadamente 41,7 mg, que multiplicado por 24 resulta em 1.000,8mg).



a: Material para preparação das lâminas; b: kit com reagente e materiais utilizados.

**Figura 10** – Preparação do método de Kato – Katz, pelo Kit Helm-Test<sup>®</sup>.

**Fonte:** Elaboração da autora, 2011 e Arquivos do LPPBM.

Foram preparadas três lâminas de cada amostra de fezes, através da técnica descrita acima, e a carga parasitária foi determinada pela média do número de ovos por grama de fezes (OPG). A média aritmética de OPG calculada para as 03 lâminas ( $OPG = \text{Soma do nº de ovos} \times 24 / \text{nº lâminas analisadas}$ ) foi utilizada para determinação da intensidade da infecção por *S. mansoni*.

### **3.5.2.2 Método de Lutz (LUTZ, 1919)**

Tomou-se 2 a 4 gramas de fezes frescas, colocou-se em um frasco de Borrel e homogeneizou-se em água destilada, com o auxílio de um bastão de vidro. A emulsão foi filtrada através de uma tela de plástico para dentro de cálice cônico. Completou-se o volume do cálice juntando mais água e misturando bem o seu conteúdo. Deixou-se sedimentar por duas horas. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, retirou-se uma pequena amostra de sedimento, colocando sobre uma lâmina de microscopia e cobriu-se com lamínula.

Realizamos a leitura de duas lâminas. Para a visualização de cistos de protozoários foi adicionado Lugol.

### **3.5.3. Diagnóstico Molecular- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para realização dessa técnica em nosso laboratório, foi necessária a viabilização de salas e equipamentos específicos. Esses foram adquiridos pelo Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos- LPPBM, através de uma parceria entre Universidade Federal do Ceará e a Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os espaços individualizados para realização de cada etapa da técnica e os equipamentos (Figura 11) foram obtidos para uso exclusivo, em busca do desenvolvimento de estudos de diagnóstico molecular para esquistossomose, uma recente linha de pesquisa em nosso laboratório.

#### **3.5.3.1 Extração do DNA**

##### **3.5.3.1.1. Protocolo de extração através de um método comercial (Kit Fast DNA Spin- MP Biomedicals Solon, OH, USA)**

Realizou-se a extração de DNA total, utilizando-se o Kit Fast DNA Spin (Bio 101, Vista, Califórnia), de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado 400µL do tampão CLS-VF a um tubo Lysing Matrix A, 300 µL da amostra fecal (preparada a partir de um grama de fezes não preservada, estocada a -20°C, dissolvida em água deionizada), 200µL do tampão PPS e 20µL de PVP. Os tubos foram agitados, horizontalmente, por 10 s na velocidade de 5.5ms<sup>-1</sup>, no Fast Prep Cell Disruptor (FP120- MP Biomedical).

Em seguida centrifugou-se o conteúdo dos tubos por 10 minutos a 14.000 xg; 600 µL de sobrenadante foram transferidos para um microtubo limpo, adicionando-se 600 µL de matriz de ligação (Binding Matrix) e agitando-se os tubos durante 1 minuto por inversão. Os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente e centrifugados por 1 minuto a

14.000 xg. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de solução de lavagem (SEWS-M) e homogeneizou-se e centrifugou-se por mais 1 min.



**Figura 11** – Salas e equipamentos específicos para Biologia Molecular ; a. Salas específicas para realização de cada etapa; b. Capela para extração de DNA de fezes e a capela para PCR, respectivamente.

**Fonte:** Elaboração da autora, 2011.

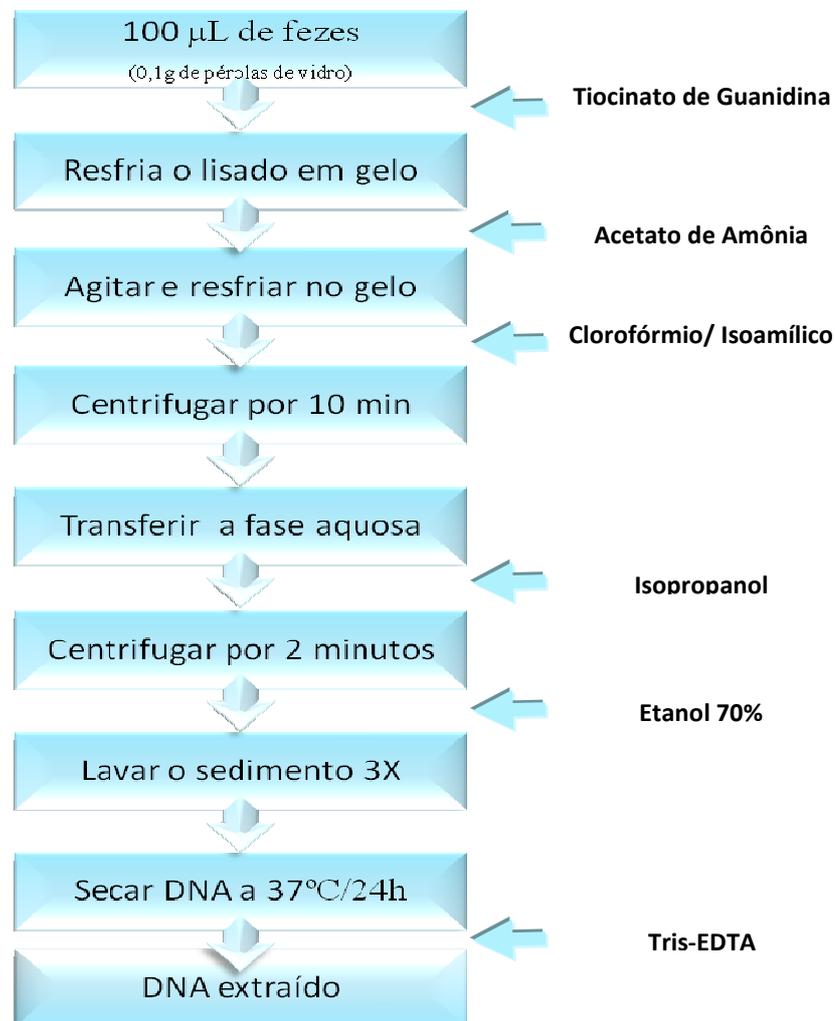
Novamente o sobrenadante foi descartado sem descartar a resina e centrifugou-se por mais 15 segundos para retirar todo resíduo. A seguir foi adicionado 100 $\mu$ L de solução DES e o precipitado ressuspenso. Incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 xg. Sendo a solução de DNA transferida para novo tubo. O DNA das 56 amostras analisadas foi extraído por esta técnica.

### 3.5.3.1.2. Protocolo de extração segundo Santos *et al.*,2007

Utilizou-se um grama de fezes não preservada e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , dissolvida em água deionizada. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram preparadas e adicionou-se 500  $\mu$ L da solução de Tiocianato de Guanidina 5M e 0,1g de pérolas de vidro (SIGMA G-8893), para promover a lise do parasita. Todos os tubos foram fechados, homogeneizados e agitados em vortex (modelo QL901) por 5 minutos e depois incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Resfriaram-se os lisados por 2 minutos no gelo e adicionou-se 250  $\mu$ L de acetato de amônio 7.5M. Realizou-se agitação por inversão seguida de incubação no gelo por 10 minutos. Adicionou-se 500  $\mu$ L de clorofórmio - álcool isoamílico na concentração de (24:1 v/v). Novamente todos os microtubos foram fechados e agitados lentamente por inversão e centrifugou-se a 13000 xg (Centrífuga 5415c, Eppendorf, Alemanha) durante 10 minutos. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para um novo microtubo devidamente identificado, retirando-a com pipeta de 200  $\mu$ L. Ao volume obtido da fase aquosa adicionou-se 0,54 volumes de isopropanol para precipitação do DNA.

Todos os microtubos foram fechados e agitados gentilmente, por inversão e centrifugou-se a 4.000 xg durante 2 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se os

precipitados com etanol a 70%, utilizando 1 mL de etanol, por cinco vezes. Mais uma vez, todos os microtubos fechados, foram agitados gentilmente por inversão e centrifugou-se a 4.000 xg durante 2 minutos. Por fim, os microtubos que continham o DNA foram deixados abertos em estufa de secagem por 24 horas, para evaporação do álcool, uma vez que esse pode ser um dos inibidores da PCR. No dia seguinte adicionou-se 50 µL de Tris-EDTA 0,5M , pH 8.0 para dissolver o DNA e colocou-se em banho-maria a 58°C por 1 hora para soltar o que estava aderido na parede do tubo. Os microtubos foram armazenados em freezer a -20°C para realização da técnica de PCR, posteriormente. Por esta técnica foi extraído o DNA de 17 amostras. Esse protocolo está expresso na figura 12.



**Figura 12** – Técnica de extração de DNA seguindo protocolo de Santos *et al.*,2007

**Fonte:** Elaboração da autora, 2010.

### 3.5.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os parâmetros da PCR seguiram o protocolo de Pontes *et al.*, 2002.

Para cada reação realizada foi incluído: controle positivo/DNA (DNA de *S. mansoni*, cedido pelo Laboratório Diagnóstico Imunológico e Molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias, do Instituto de Microbiologia da UFRJ); controle positivo/fezes (amostra fecal positiva pelos métodos parasitológicos de Kato-Katz, Gradiente Salínico e Helmintex<sup>®</sup>); controle negativo (extração de amostra fecal de um indivíduo comprovadamente negativo para *S. mansoni* pelo exame parasitológico de fezes); branco da reação (todos os reagentes utilizados, exceto DNA que foi substituído por água ultra-pura).

Foram utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) descritos por Hamburger *et al.*,(1991), SMFPONTES- 5'-GAT CTG AAT CCG ACC ACC CG-3' e SMRPER 5'-TAT TAA CGC CCA CGC TCT CG-3', a partir de sequências de uma região altamente repetitiva ao longo do genoma do *S. mansoni*. O fragmento amplificado é composto por 110 pares de base (pb).

A reação foi realizada com 35 ciclos, onde cada ciclo apresentou uma fase de desnaturação a 94°C por 30 segundos, uma fase de hibridização a 55° C por 30 segundos e uma fase de extensão a 72°C por 30 segundos. Antes do primeiro ciclo ocorreu uma fase de desnaturação inicial a 94 °C por 30 segundos. A extensão final foi a 72°C por sete minutos. Na etapa de amplificação do DNA foi utilizado o termociclador geneAmpPCR System 2400 (Applied-Biosystems,CA,EUA).

O volume final da mistura de reação foi de 50µL,contendo: 48µL de MasterMix [45µL SuperMix (Invitrogen), 1µL do Primer F (10µM) e 1µL do Primer R (10µM), e 1µL de Cloreto de Magnésio (1,5mM)] e 2µL do DNA extraído.

Nas amostras que foram positivas na coproscopia, mas negativas na PCR, a presença de inibidores da PCR foi avaliada através da contaminação de amostras de fezes com DNA de *S. mansoni* (“spiking”) (Silva *et al.*,1997). Como resultado era esperado que o DNA de *S. mansoni*, empregado como contaminante das amostras, fosse amplificado, mostrando ausência de substâncias inibidoras ou que não ocorresse amplificação de nenhum produto, sinalizando a interferência de inibidores. Foi utilizado nessa reação de amplificação, 1 µL (5fg) de DNA de *S. mansoni* com 1 µL do DNA extraído das amostras negativas.

### 3.5.3.3 Detecção do produto amplificado

Empregou-se a eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen) para visualização do produto amplificado. Esse foi aplicado juntamente com o corante azul de bromofenol, na proporção de 8µL do produto para 1µL de corante. Foram aplicados cerca de 5µL do

marcador de tamanho molecular (100 pb DNA ladder, Invitrogen). O gel foi, então, submetido à tensão de 100 volts por aproximadamente duas horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (10 µl da solução concentrada de brometo de etídeo 10mg/mL em 100 mL de água destilada) por 15 minutos, em agitador. Depois o gel foi descorado em água destilada, por 30 minutos em agitador.

A visualização dos produtos no gel se dá pela reação de ligação do DNA com brometo de etídeo. Este composto tem a capacidade de inserir-se nas fendas da cadeia de DNA e apresenta fluorescência quando excitado pela radiação ultravioleta. A visualização foi realizada em sistema de fotodocumentação.

### **3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Um banco de dados foi elaborado com o auxílio do Programa Microsoft Office Excel 2007 para organização e armazenamento dos dados pessoais, clínicos e laboratoriais. Os resultados dos diferentes métodos foram analisados utilizando-se o Programa SPSS 15.0 para Windows, com a aplicação do teste de Mc Nemar para avaliar as proporções correlacionadas, sendo escolhido o teste do qui-quadrado para cálculo do valor de P.

### **3.7. ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo é parte de uma linha de pesquisa mais ampla denominada “Avaliação da Sensibilidade de Métodos para Diagnóstico da Esquistossomose Mansonii em Área de Baixa Endemicidade no Estado do Ceará”, desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Diagnóstico Imunológico e Molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, recebendo parecer favorável de nº 165/09.

Os participantes foram informados, de acordo com os preceitos éticos previstos na Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sobre os objetivos da pesquisa, a garantia de que não serão divulgados nomes ou qualquer outra informação que ponham em risco a sua privacidade, pois os resultados serão divulgados sob a forma de gráficos e dados

estatísticos, e que a qualquer momento podem desistir da pesquisa, sendo necessário que os mesmos comuniquem ao pesquisador.

Obedecendo às normas éticas que regem a pesquisa em saúde e em seres humanos, após o esclarecimento das etapas do estudo, os indivíduos que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

No caso dos indivíduos menores de idade, a autorização na participação da pesquisa ficou a cargo dos pais ou do responsável pelas crianças.

## 4. RESULTADOS

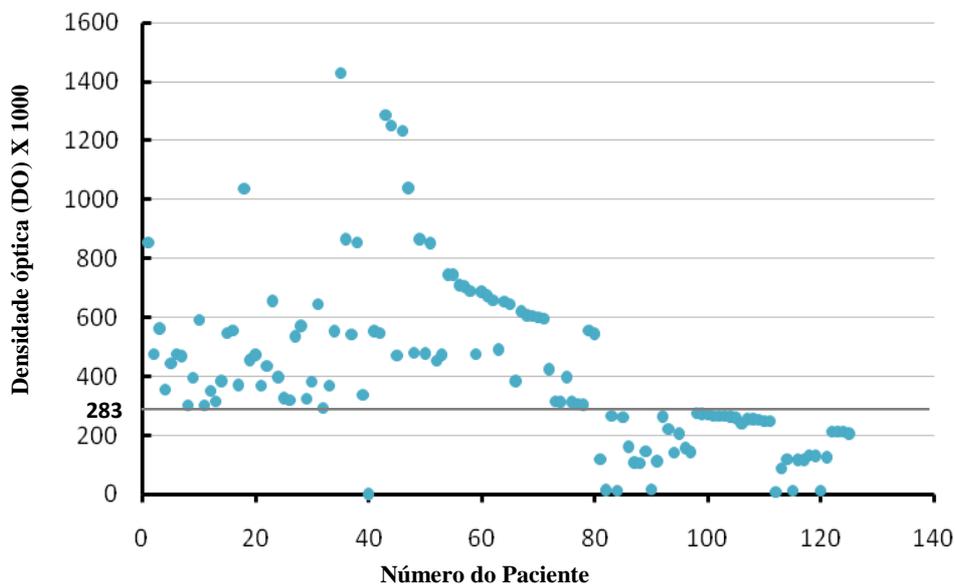
Esse estudo foi desenvolvido inicialmente com a pesquisa de anticorpos IgG anti-*S. mansoni* contra antígenos do verme adulto, através do método de ELISA em amostras de soro, seguida de coproscopia para *Schistosoma mansoni* e outros parasitos, realizada pelos métodos de Kato-Katz e Hoffman, respectivamente, em 125 amostras. Posteriormente, 56 dessas amostras, compuseram o painel de teste para a análise pela PCR.

### 4.1 RESULTADOS OBTIDOS PARA GRUPO A- Sorologia e Coproscopia

#### 4.1.1 SOROLOGIA - Método de ELISA

Dos 250 indivíduos analisados pelo método ELISA, 118 (47,2%) foram reativos e 132 (53,8%) não reativos. Desses, 125 indivíduos entregaram amostras de fezes com quantidade de material suficiente para realização das técnicas propostas. Na figura abaixo, mostramos o valor da densidade óptica (DO) desses indivíduos.

O valor do “Cut off” (limiar de reatividade) determinado foi de 0,283 ( $\pm 2DP$ ).



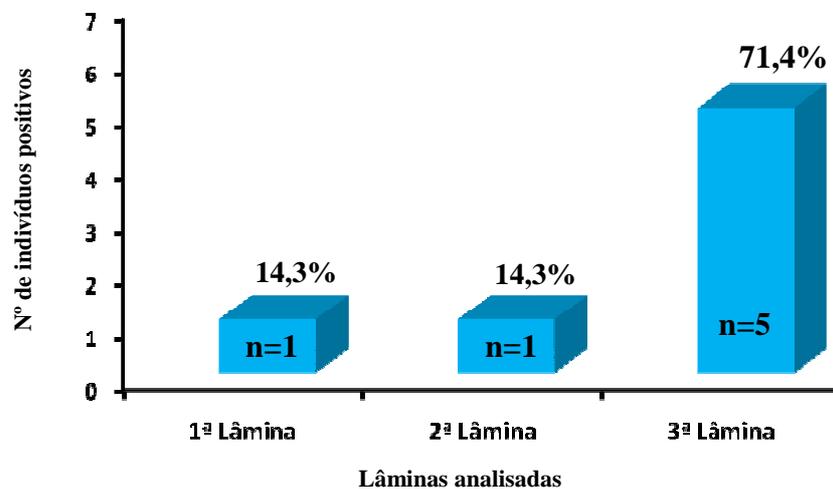
**Figura 13** – Densidade óptica dos 125 indivíduos que realizaram o teste ELISA para IgG anti-*S. mansoni*. Indivíduos residentes na localidade do Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

Dos 118 indivíduos ELISA reativos, 80 entregaram amostra de fezes com quantidade suficiente para realização de todas as técnicas coproscópicas propostas. Dos 132 indivíduos ELISA não reativos, 45 entregaram amostra de material fecal para realização da coproscopia.

## 4.1.2 COPROSCOPIA

### 4.1.2.1 Método de Kato-Katz

No método de Kato – Katz foi realizada a leitura de três lâminas de cada amostra fecal analisada. Dos 125 indivíduos que entregaram as amostras de fezes, foram encontradas 7 (5,6%) amostras positivas para *S. mansoni*, com somente uma amostra positiva na primeira lâmina, uma positiva na segunda lâmina e cinco positivas apenas na terceira lâmina (Figura 14). Todos esses indivíduos apresentavam ELISA reativo.



**Figura 14** - Distribuição do número de indivíduos positivo para *S. mansoni*, por lâmina analisada, detectados através do método de Kato – Katz - Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

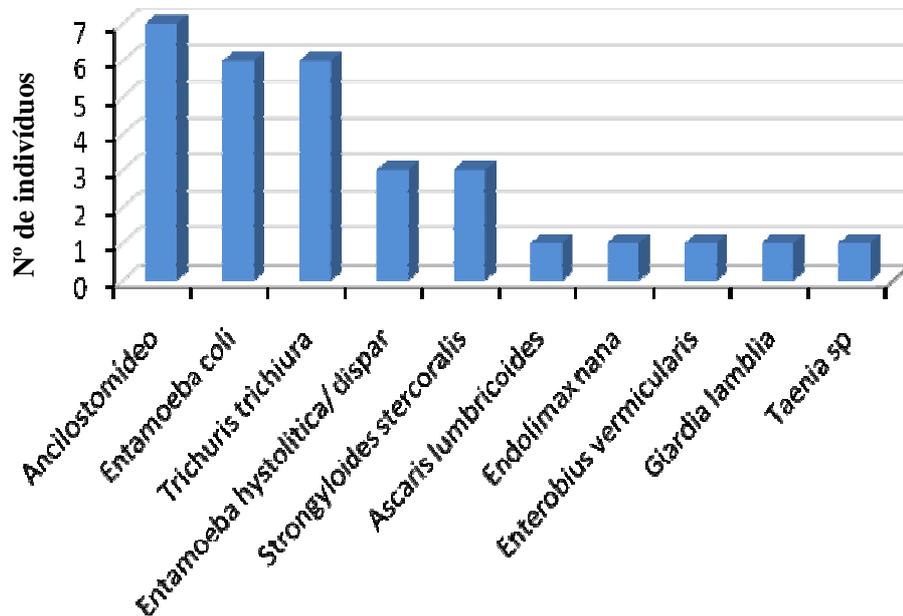
Outros parasitos encontrados por este método foram: *Trichuris trichiura*, em 5 pacientes (4,0%) e *Taenia* sp. em 3 (2,4%).

### 4.1.2.2 Método de Lutz

No método de Lutz, dos 125 indivíduos analisados foi detectada a presença de parasitos em 24 indivíduos. Desses, 17 possuíam ELISA reativo e 07 ELISA não reativo.

Foram detectados 07 indivíduos com ancilostomídeo (5,6%), 06 com *Entamoeba coli* (4,8%), 06 com *Trichuris trichiura* (4,8%), 03 o complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (2,4%), 03 com larvas de *Strongyloides stercoralis* (2,4%), 01 com *Ascaris lumbricoides* (0,8%), 01 com *Endolimax nana* (0,8%), 01 com *Enterobius*

*vermicularis* (0,8%), 01 com *Giardia lamblia* (0,8%), 01 com *Taenia* sp (0,8%). Esses dados são mostrados abaixo, na Figura 15.



**Figura 15** - Número de parasitos detectados pelo método de Lutz, nos indivíduos em estudo, da localidade Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

## 4.2 RESULTADOS OBTIDOS PARA GRUPO B- Sorologia, Coproscopia e PCR

### 4.2.1 SOROLOGIA- Método de ELISA

Dos 125 indivíduos que entregaram amostra de soro e amostras de fezes com quantidade de material suficiente para realização das técnicas propostas, utilizamos 56 amostras de fezes para análise pela técnica de PCR. Na figura 16, mostramos o valor da densidade óptica (DO) desses indivíduos.

O valor do “Cut off” (limiar de reatividade) determinado foi de 0,283 ( $\pm 2DP$ ).

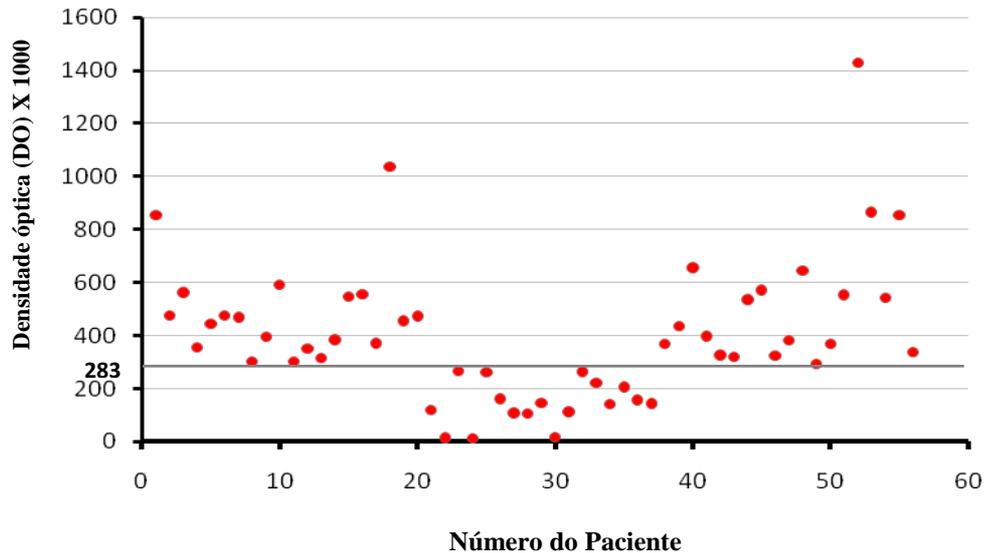
### 4.2.2 COPROSCOPIA

#### 4.2.2.1 Método de Kato-Katz

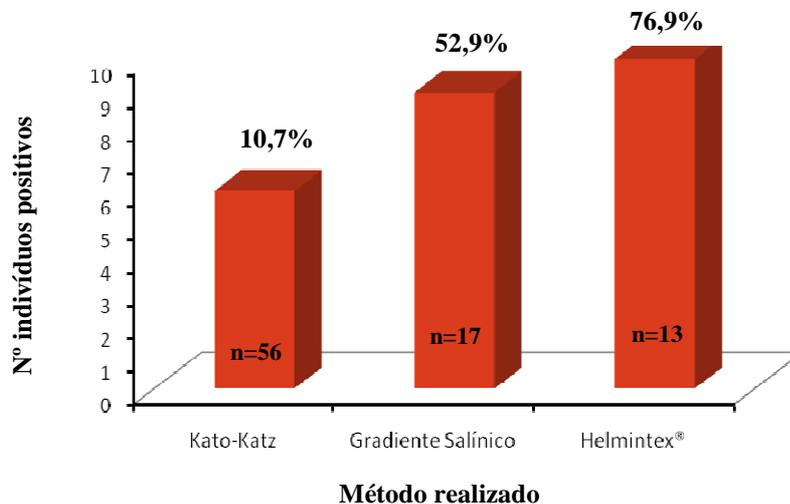
No método de Kato-Katz, dos 56 indivíduos avaliados, foram encontradas 6 (10,7%) positivos para *S. mansoni*.

Dados obtidos de outra etapa desse estudo mostraram que pelo método do Gradiente Salínico, realizado em 17 amostras, detectou-se 9 (52,9 %) amostras positivas para *S. mansoni* e pelo método do Helminx®, realizado em 13 amostras, foram detectadas 10

(76,9%) amostras positivas para *S. mansoni*. Esses dados são mostrados na Figura 17. Todos esses indivíduos apresentavam ELISA reativo. Obtivemos um total de 19 amostras positivas para *S. mansoni*, pela coproscopia.



**Figura 16** – Densidade óptica obtida pelo teste ELISA para IgG anti-*S. mansoni*, dos 56 indivíduos que compuseram a amostragem analisada pela técnica de PCR. Indivíduos do Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

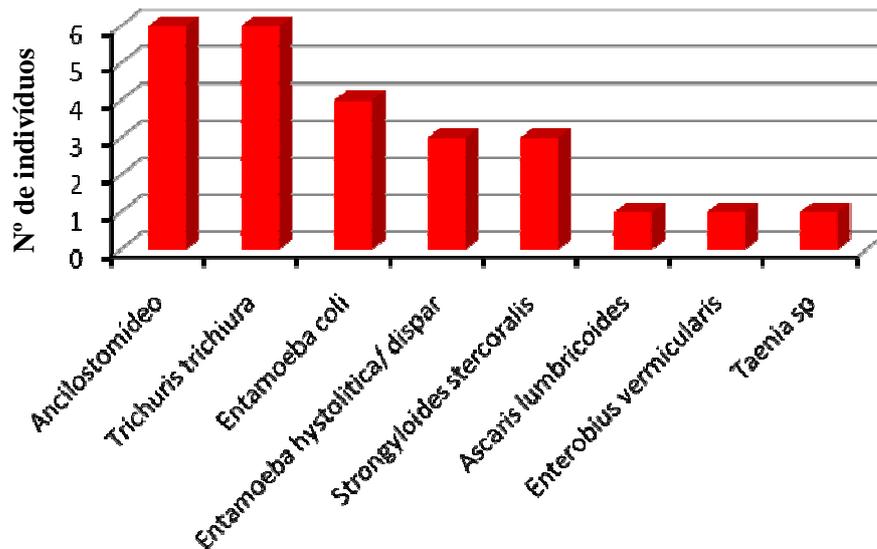


**Figura 17** - Distribuição do número de indivíduos positivo para *S. mansoni*, por método coproscópico realizado, em indivíduos do Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

#### 4.2.2.2 Método de Lutz

Dos 56 indivíduos analisados foi detectado a presença de parasitos em 19 indivíduos. Desses, 12 possuíam ELISA reativo e 07 ELISA não reativo.

Foram detectados 06 com ancilostomídeo (31,6%), 06 indivíduos com *Trichuris trichiura* (31,6%), 04 com *Entamoeba coli* (21,0%), 03 o complexo *Entamoeba hystolitica/Entamoeba dispar* (15,8%), 03 com larvas de *Strongyloides stercoralis* (15,8%) 01 com *Ascaris lumbricoides* (5,2%), 01 com *Enterobius vermicularis* (5,2%), e 01 com *Taenia* sp (5,2%). Esses dados são mostrados abaixo.



**Figura 18** - Número de parasitos detectados pelo método de Lutz, nos 56 indivíduos do Grupo B, provenientes da localidade Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

## 4.2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 4.2.3.1 Técnica de PCR

Para realização da técnica de PCR convencional foi utilizado, o protocolo de extração através de um método comercial (Kit Fast DNA) nas 56 amostras. Utilizamos em ambos os casos o par de iniciadores originalmente descrito por Hamburger *et al.*,(1991). Estes iniciadores hibridizam com uma região altamente repetitiva ao longo do genoma do parasito (SMEGG1/SMEEG2). O produto amplificado foi de 110 pb.

Vale ressaltar que, se observa também a presença de outros fragmentos de DNA com tamanhos superiores a 110 pb, que são, na verdade, bandas amplificadas em decorrência da grande quantidade de oligonucleotídeos livres, complementares de uma sequência repetitiva de DNA.

Comparando-se os resultados obtidos para as 56 amostras analisadas pelos métodos de Kato-Katz (recomendado pela Organização Mundial de Saúde), e o PCR, verificamos que o

método de Kato-Katz detectou 06 (10,7%) das 56 amostras, enquanto o método de PCR detectou 21(37,5%) amostras como positivas.

As 56 amostras de fezes analisadas foram distribuídas em cinco grupos, conforme descrito no item 3.3.1.1 do material e métodos.

O grupo I foi composto de 10 amostras de fezes de indivíduos com exame parasitológico negativo, sorologia reativa para infecção pelo *S. mansoni* e presença de outros parasitos, no qual a PCR detectou a presença do fragmento de DNA do parasito em 20% (02) das amostras. Nessas amostras houve co-infecção apenas por *Trichuris trichiura*. Os resultados estão expressos na tabela 1.

O grupo II foi composto de 10 amostras de fezes de indivíduos com exame parasitológico negativo, sorologia reativa para infecção pelo *S. mansoni* e ausência de outros parasitos, no qual a PCR detectou a presença do fragmento de DNA do parasito em 40% (04) das amostras. Os resultados estão expressos na tabela 1.

O grupo III foi composto de 07 amostras de fezes de indivíduos com exame parasitológico negativo, sorologia não reativa para infecção pelo *S. mansoni* e presença de outros parasitos, no qual a PCR detectou em 01(14,3%) amostra a presença do fragmento de DNA do parasito. Os resultados estão expressos na tabela 2.

O grupo IV foi composto de 10 amostras de fezes de indivíduos com exame parasitológico negativo, sorologia não reativa para infecção pelo *S. mansoni* e ausência de outros parasitos, no qual a PCR detectou em 01(10%) amostra a presença do fragmento de DNA do parasito. Os resultados estão expressos na tabela 2.

No grupo V, composto por 19 amostras com coproscopia para positiva *S. mansoni*, por um ou mais dos métodos coproscópicos realizados e ELISA reativo, a PCR detectou a presença de DNA do parasito em 13 (68,4%) das 19 amostras. Estes resultados estão sumarizados na tabela 3.

No intuito de verificar a presença de substâncias inibidoras nas reações de amplificação, 06 amostras de fezes de indivíduos que eliminavam ovos de *S. mansoni* e negativas no PCR, foram contaminadas com 5fg de DNA de *S. mansoni* (“spiking”). Dessas, 04 amostras tiveram o DNA de *S. mansoni* amplificado pela PCR, servindo, portanto, como indicador da ausência de interferência de inibidores e em 02 amostras não ocorreu nenhuma amplificação, o sugere que pode ter ocorrido a presença de inibidores da reação.

No método de Kato-Katz, a carga parasitária, número de ovos por grama de fezes (OPG), foi calculada pela multiplicação do número de ovos encontrados pelo fator de conversão 24.

**Tabela 1:** Resultados dos métodos realizados nas amostras de fezes do Grupo I (A1-A10) e do Grupo II (B1-B10), amostras de indivíduos residentes em Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

Indivíduos	ELISA- IgG	Kato-Katz	HOFFMAN	PCR
A1	Reativo	Negativo	<i>S. stercoralis</i> <i>T. trichiura</i>	Negativo
A2	Reativo	Negativo	Ancilostomídeo	Negativo
A3	Reativo	Negativo	<i>T. trichiura</i>	Positivo
A4	Reativo	Negativo	Ancilostomídeo	Negativo
A5	Reativo	Negativo	<i>T. trichiura</i>	Positivo
A6	Reativo	Negativo	Ancilostomídeo	Negativo
A7	Reativo	Negativo	<i>S. stercoralis</i>	Negativo
A8	Reativo	Negativo	<i>Taenia</i> sp	Negativo
A9	Reativo	Negativo	Ancilostomídeo <i>T. trichiura</i>	Negativo
A10	Reativo	Negativo	Ancilostomídeo <i>T. trichiura</i>	Negativo
B1	Reativo	Negativo	Negativo	Positivo
B2	Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
B3	Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
B4	Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
B5	Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
B6	Reativo	Negativo	Negativo	Positivo
B7	Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
B8	Reativo	Negativo	Negativo	Positivo
B9	Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
B10	Reativo	Negativo	Negativo	Positivo

**Tabela 2:** Resultados dos métodos realizados nas amostras de fezes do Grupo III (C1-C7) e do Grupo IV (D1-D10), amostras de indivíduos residentes em Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

Indivíduos	ELISA- IgG	Kato-Katz	Hofmann	PCR
C1	Não Reativo	Negativo	<i>S. stercoralis</i>	Negativo
C2	Não Reativo	Negativo	Ancilostomideo	Negativo
C3	Não Reativo	Negativo	<i>T. trichiura,</i> <i>E.histolytica/dipar, E. coli</i>	Negativo
C4	Não Reativo	Negativo	<i>E. vermicularis</i>	Negativo
C5	Não Reativo	Negativo	<i>E.coli</i> <i>E.histolytica/dispar</i>	Negativo
C6	Não Reativo	Negativo	<i>A. lumbricoides</i>	Negativo
C7	Não Reativo	Negativo	<i>E. histolytica/dispar</i>	<b>Positivo</b>
D1	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D2	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D3	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D4	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D5	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D6	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D7	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D8	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D9	Não Reativo	Negativo	Negativo	Negativo
D10	Não Reativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>

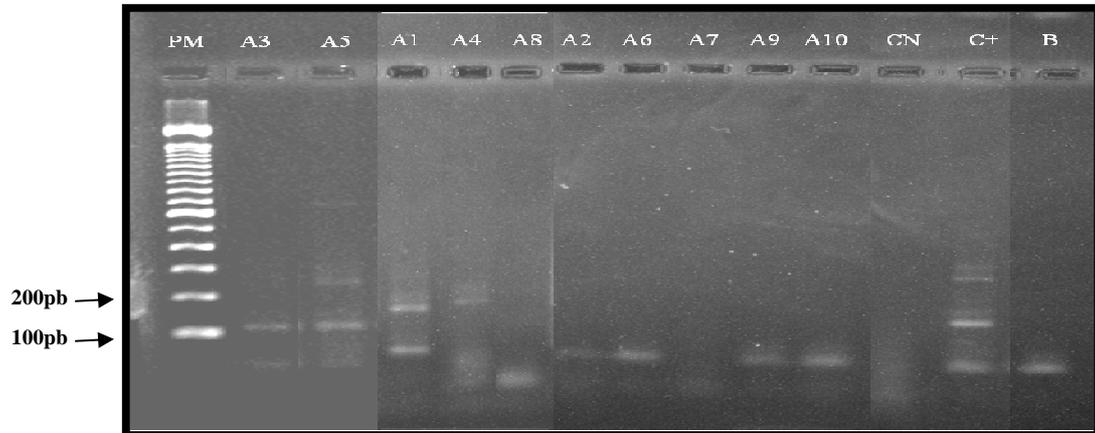
No método do Gradiente Salínico, como para o seu desenvolvimento empregam-se 500mg de fezes, a carga parasitária individual foi calculada através da multiplicação do número de ovos encontrados no material examinado por dois. No método de Helmintex, devido à análise ser realizada com 30 g de fezes, para cálculo do OPG o número de ovos encontrados na amostra analisada foi dividido por trinta.

**Tabela 3:** Resultados dos métodos de Kato-Katz, Gradiente Salínico, Helmintex e PCR das 19 amostras de fezes positivas na coproscopia, Grupo V (E1-E19), provenientes de indivíduos residentes em Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

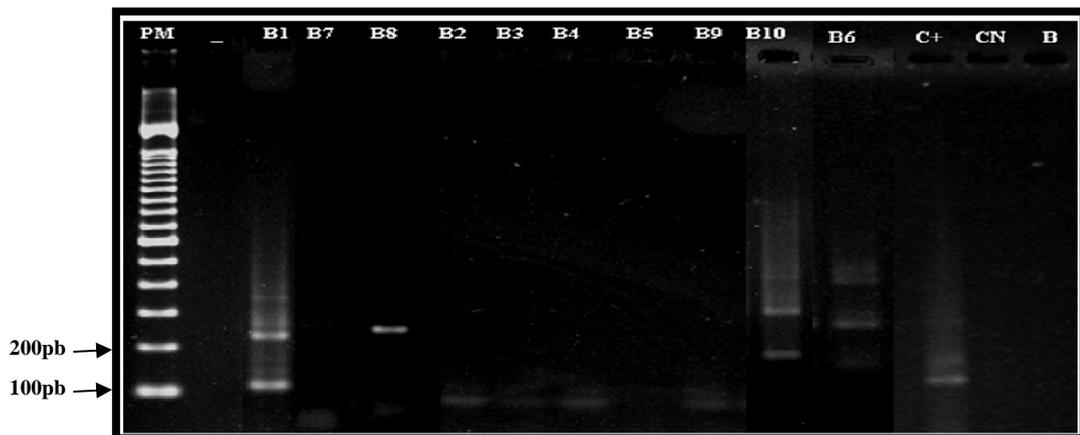
Indivíduos	COPROSCOPIA (OPG)			
	Kato-Katz	Gradiente Salínico	Helmintex	PCR
E1	Negativo	Positivo (10,0)	Negativo	Positivo
E2	Negativo	Negativo	Positivo (0,10)	Negativo
E3	Negativo	Positivo (2,0)	Positivo (0,13)	Positivo
E4	Negativo	Negativo	Positivo (0,17)	Positivo
E5	Positivo (8,0)	Positivo (10,0)	Positivo (0,47)	Positivo
E6	Negativo	Positivo (6,0)	Positivo (0,13)	Positivo
E7	Positivo (8,0)	NR*	Positivo (4,77)	Positivo
E8	Negativo	Positivo (2,0)	Negativo	Negativo
E9	Negativo	Positivo (6,0)	NR	Positivo
E10	Negativo	Positivo (2,0)	NR	Positivo
E11	Positivo (8,0)	NR	NR	Positivo
E12	Positivo (8,0)	Negativo	NR	Positivo
E13	Negativo	Negativo	Positivo (0,20)	Positivo
E14	Positivo (8,0)	Negativo	Negativo	Negativo
E15	Negativo	Positivo (2,0)	NR	Negativo
E16	Positivo (8,0)	Negativo	Positivo (0,20)	Positivo
E17	Negativo	Negativo	Positivo (0,20)	Negativo
E18	Negativo	Positivo (2,0)	NR	Positivo
E19	Negativo	Negativo	Positivo (0,30)	Negativo

\*NR= Não realizado, por ausência de amostra com quantidade de fezes requerida.

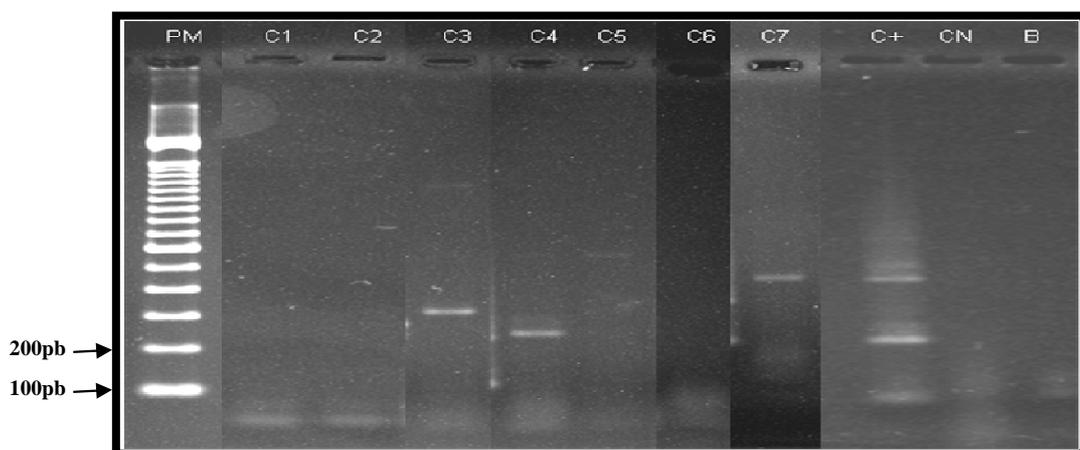
O produto gerado de 110 pb pela amplificação do par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 foi observado em gel de agarose 2% (Figuras 19,20,21,22 e 23).



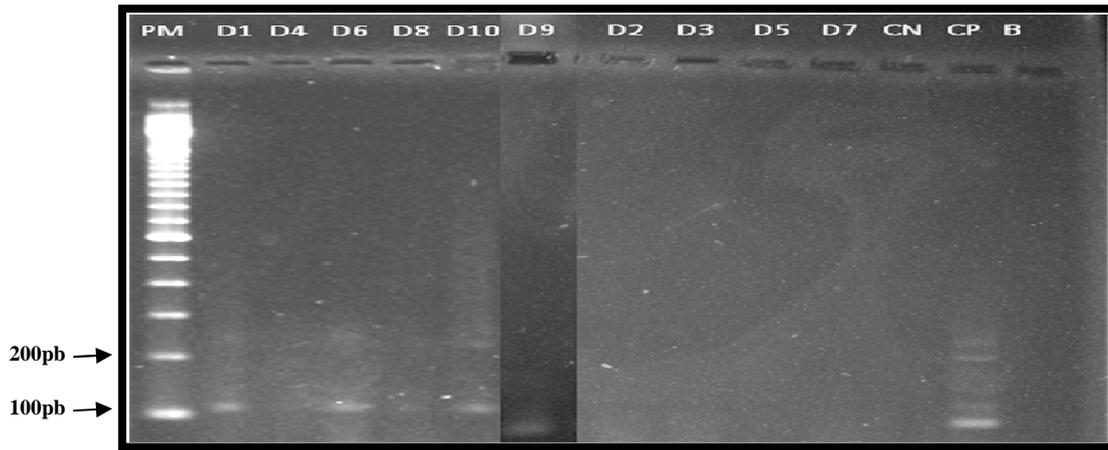
**Figura 19** - Produto amplificado pela PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 nas amostras do Grupo I. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; A1-A10 – amostras teste; CN- controle negativo; C+- controle positivo; B- branco.



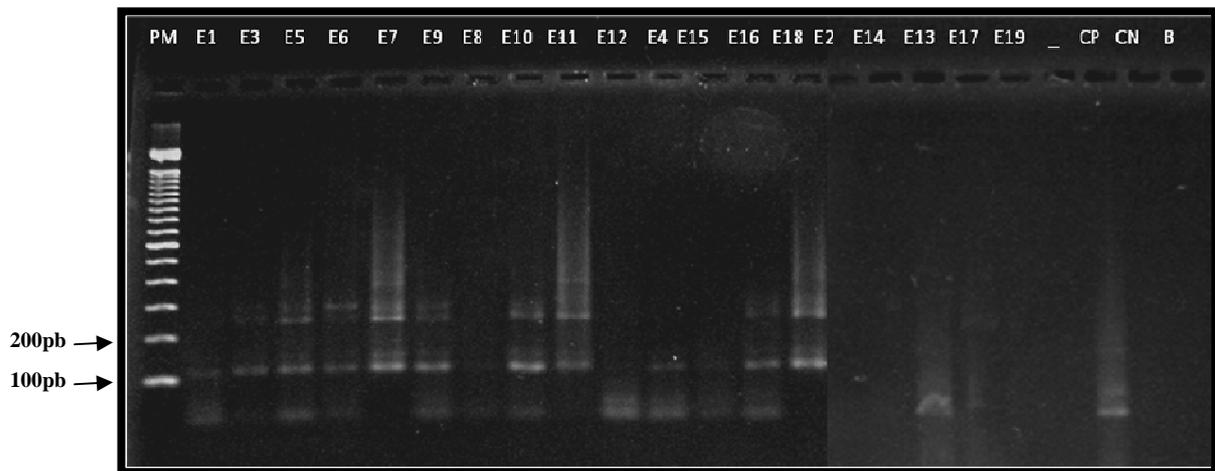
**Figura 20** - Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 nas amostras do Grupo II. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; B1-B10 – amostras teste; C+- controle positivo; CN- controle negativo; B- branco.



**Figura 21** - Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 nas amostras do Grupo III. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; C1-C10 – amostras teste; C+ - controle positivo; CN- controle negativo; B- branco.



**Figura 22** - Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 nas amostras do Grupo IV. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; D1-D10 – amostras teste; CN- controle negativo; CP- controle positivo; B- branco.



**Figura 23**- Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2, nas amostras do Grupo V. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; E1-E10 – amostras teste; CP- controle positivo; CN- controle negativo; B- branco.

Ao cruzarmos os resultados dos métodos coproscópicos com os resultados da PCR obtidos para os pacientes que compuseram o grupo V, observamos que dos 19 pacientes que foram avaliados através do método de Kato – Katz e do PCR, 05 foram positivos em ambos os métodos, 08 positivos apenas no PCR, 01 apenas no Kato – Katz e 05 foram negativos em ambos. Constatou-se diferença estatisticamente significante entre os métodos Kato-Katz e PCR em relação à proporção de pacientes portadores de esquistossomose, ou seja, a proporção de detecções pelo método de PCR (68,42%) foi significativamente maior ( $P = 0,002$ ) que a proporção de detecções pelo Kato-Katz (31,58%), como mostra a Tabela 4.

O método do PCR detectou 08 pacientes que não haviam sido detectados no método do Kato – Katz.

**Tabela 4:** Comparação entre os métodos Kato-Katz e PCR na detecção da esquistossomose mansoni. Número amostral = 19. Dados analisados pelo teste de McNemar para variáveis categóricas emparelhadas.

PCR	Kato-Katz		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	8	13 (68,42%)
Negativo	1	5	6 (31,58%)
Total	6 (31,58%)	13(68,42%)	19

P = 0,002 (Teste de Qui-Quadrado).

O método de Gradiente Salínico e o método de PCR foram realizados em 17 pacientes do Grupo V, dos quais 07 foram positivos em ambos, 04 foram positivos apenas no PCR, 02 apenas no Gradiente Salínico.

Constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos PCR e Gradiente Salínico em relação à proporção de pacientes portadores da esquistossomose (P=0,688), ou seja, a proporção de detecções pelo método do PCR (64,70%) foi estatisticamente semelhante à proporção de detecções pelo Gradiente Salínico (52,94%), como mostra a Tabela 5.

**Tabela 5:** Comparação entre os métodos PCR e Gradiente Salínico na detecção da esquistossomose mansoni. Número amostral=17. Dados analisados pelo teste de McNemar para variáveis categóricas emparelhadas.

PCR	Gradiente Salínico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	7	4	11(64,70%)
Negativo	2	4	6 (35,29%)
Total	9 (52,94%)	8 (47,05%)	17

P = 0,688( Teste de Qui-Quadrado).

O método do PCR detectou 04 pacientes que não foram detectados no método do Gradiente Salínico.

O método de Helmintex<sup>®</sup> e o método de PCR foram realizados em 13 pacientes do grupo V, dos quais 07 foram positivos em ambos, 03 foram positivos apenas no Helmintex<sup>®</sup> e 01 apenas no PCR.

Constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos PCR e Helmintex<sup>®</sup> em relação à proporção de pacientes portadores da esquistossomose ( $P = 0,125$ ), ou seja, a proporção de detecções pelo método do PCR (61,54%) foi estatisticamente semelhante à proporção de detecções pelo Helmintex<sup>®</sup> (76,92%), como mostra a Tabela 6.

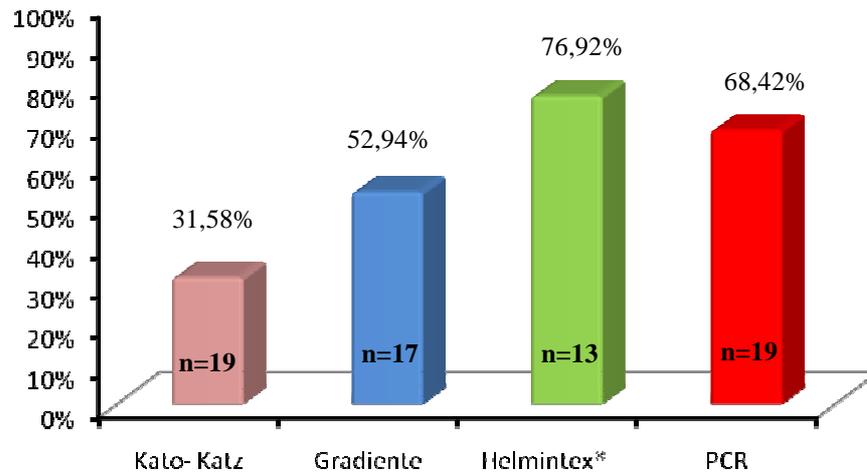
**Tabela 6:** Comparação entre os métodos PCR e Helmintex<sup>®</sup> na detecção da esquistossomose mansoni. Número amostral=13. Dados analisados pelo teste de McNemar para variáveis categóricas emparelhadas.

PCR	Helmintex <sup>®</sup>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	7	1	8 (61,54%)
Negativo	3	2	5 (38,46%)
<b>Total</b>	<b>10 (76,92%)</b>	<b>3 (23,07%)</b>	<b>13</b>

$P = 0,125$  ( Teste de Qui-Quadrado).

#### 4.3 COMPARAÇÃO DAS PREVALÊNCIAS DETERMINADAS PARA O [Grupo V].

Os quatro métodos realizados para diagnóstico da Esquistossomose mansoni nas amostras do Grupo V, apresentaram índices de prevalência diferentes, como mostra a figura a seguir.



**Figura 24** – Prevalências da esquistossomose mansoni, detectadas através dos métodos de Kato – Katz, Gradiente Salínico, Helmintex® e PCR- Planalto do Cajueiro, Maranguape-CE.

#### 4.4 COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

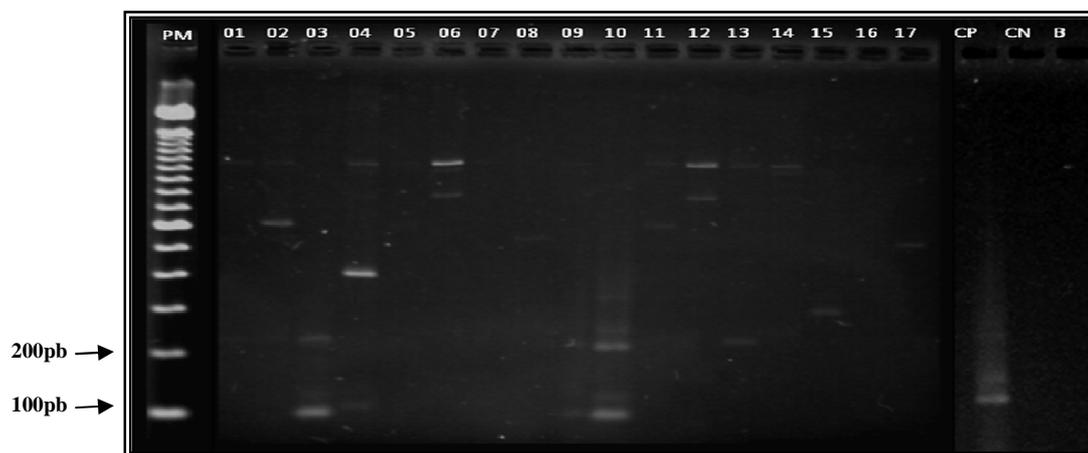
Para realização de comparação da sensibilidade do processo de extração foi realizado em 17 das amostras testadas pela PCR, a extração de DNA pelo método comercial do Kit Fast DNA Spin- MP Biomedicals Solon e também pelo protocolo de Santos *et al.*,(2007).

Essas amostras faziam parte dos seguintes grupos, do Grupo B: 5 amostras do Grupo I (13,14,15,16,17), 5 do Grupo II (01,02,03,04,05), 2 do Grupo III (06,07) e 5 do Grupo IV (08,09,10,11,12).

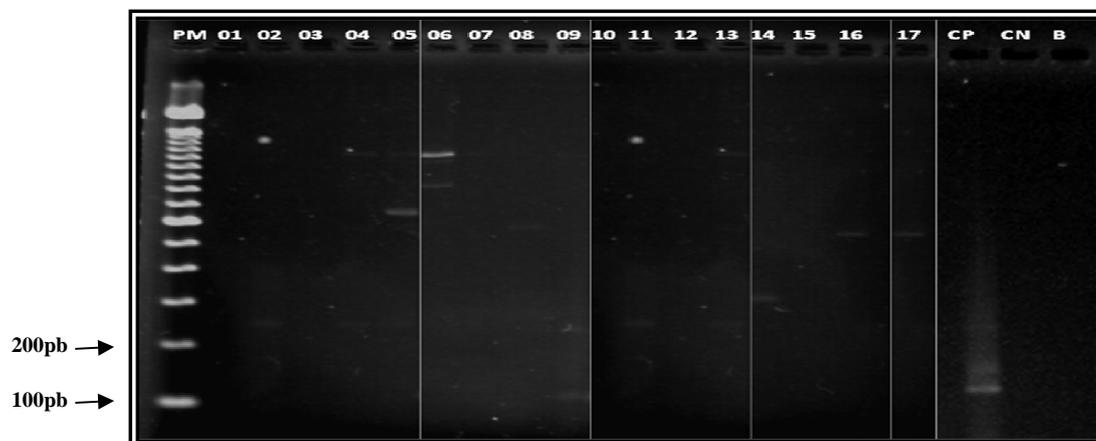
Verificamos que nessas amostras, a extração realizada pelo Kit Fast DNA permitiu a detecção pela PCR de 03 amostras, já utilizando a extração de DNA, segundo o protocolo de Santos *et al.*,2007, não detectou-se nenhuma amostra. Das amostras detectadas, duas faziam parte do Grupo II, ELISA reativo e sem presença de outros parasitos, as amostras 03 e 04; e uma do Grupo IV, ELISA não reativo e ausência de outros parasitos, a amostra 10.

Na figura 25 mostramos o produto gerado de 110 pb pela amplificação nessas amostras, observado em gel de agarose 2%, obtido quando utilizado na técnica de PCR, DNA extraído pelo Kit comercial.

Já na figura 26 visualizamos o gel em agarose 2%, quando utilizamos DNA extraído pelo protocolo de Santos *et al.*,(2007).



**Figura 25** - Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 nas 17 amostras extraídas pelo Kit Fast DNA. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; 01-17 – amostras teste; CN- controle negativo; CP- controle positivo; B- branco.



**Figura 26** - Produto amplificado da PCR utilizando o par de iniciadores SMEGG1/SMEEG2 nas 17 amostras extraídas pelo protocolo de Santos *et al.*,2007. Tamanho do produto: 110pb. PM- padrão de tamanho molecular; 01-17 – amostras teste; CN- controle negativo; CP- controle positivo; B- branco.

## 5. DISCUSSÃO

---

Nos últimos anos, houve uma mudança no perfil da esquistossomose em algumas regiões do Brasil devido à implementação de intervenções de controle, desde 1976. Estas medidas de controle tiveram um impacto incontestável sobre prevalência, intensidade de infecção e morbidade. Todavia, no Estado do Ceará ainda ocorre a persistência da transmissão e quadros de infecções leves, na sua grande maioria. A infecção por *S. mansoni* é considerada leve quando o hospedeiro elimina menos que 100 ovos do parasito por grama de fezes. Devido a esses baixos índices, tem sido necessário o emprego de métodos de diagnóstico de alta sensibilidade.

Os métodos parasitológicos de fezes, utilizados de rotina, para diagnóstico da infecção por *S. mansoni* baseiam-se na detecção de ovos excretados, pois esses possuem morfologia facilmente identificável. O diagnóstico parasitológico de fezes tem as vantagens da alta especificidade e de exigir equipamentos relativamente simples e, em áreas de alta endemicidade, pessoal apenas com formação de base. No entanto, há algum tempo, se reconheceu que a falta de sensibilidade de detecção por estes se deve a imprecisão na contagem de ovos (De Vlas e Gryssels, 1992).

São necessários investimentos em estudo e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para a esquistossomose (Rabello, 1997), para obter-se uma avaliação precisa da situação epidemiológica (Berquist *et al.*, 2009). Para que as doenças possam ser devidamente controladas e monitoradas, é essencial que se disponha de métodos diagnósticos cada vez mais acurados. Dentre tantas, a esquistossomose, devido à elevada prevalência e incidência, é uma doença cujos esforços para o desenvolvimento de testes diagnósticos melhores e mais sensíveis se justificam (Melo, 2006).

Os métodos imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose assumem cada dia maior importância devido a sua especificidade, sensibilidade, rapidez e simplicidade. As técnicas de detecção de anticorpos continuam sendo instrumento de valor indubitável a ser utilizada em estudos populacionais, assim, a sua incorporação aos programas de controle, em área de baixa endemicidade, é imprescindível (Noya *et al.*, 1999). A técnica imunológica indicada para o diagnóstico em massa da esquistossomose é a técnica de ELISA. Este ensaio cumpre os requisitos de baixo custo, reprodutibilidade, objetividade, resultados rápidos e automação (Noya *et al.*, 2006).

No nosso estudo, ao utilizarmos o método sorológico de IgG-ELISA, com antígeno de verme adulto de *S. mansoni*, na população do Planalto do Cajueiro, como ferramenta de diagnóstico inicial, para posterior comparação com resultados obtidos por outras técnicas coproscópicas e molecular, observamos que dos 250 indivíduos analisados, 118 (47,2%) foram reativos e 132 (52,8%) não reativos, o que corrobora com o estudo de Gonçalves *et al.*, 2006, realizado com 269 indivíduos de Paracambi-RJ, uma área endêmica de baixa transmissão, na qual encontraram 128 (48%) soros reativos.

Destes 250, apenas 125 indivíduos entregaram amostras de fezes com quantidade suficiente para realização das outras técnicas propostas. Dos 125 indivíduos, 80 (64%) foram ELISA reativo e 45 (36%) foram ELISA não reativo. Uma desvantagem dessa técnica é que quando realizada com antígeno bruto de *S. mansoni* superestima a prevalência da infecção, uma vez que não faz a distinção entre infecções ativa/passada (Noya *et al.*, 2006).

Uma vez que a coprologia é um método imprescindível para o diagnóstico da esquistossomose, por ser um método prático e de baixo custo, por evidenciar o parasito diretamente e permitir a contagem de ovos, o que, neste caso, pode ser indicativo da intensidade da infecção e oferecer possibilidade de comparação com outros trabalhos (Gonçalves *et al.*, 2005), demos continuidade ao nosso estudo, realizando a coproscopia para *S. mansoni* e outros parasitos, pelos métodos de Kato-Katz e Lutz, respectivamente.

Apesar das técnicas parasitológicas de fezes variarem consideravelmente quanto a sensibilidade, dependendo da quantidade de fezes examinadas, do número de ovos eliminados e de fatores inerentes a perda intrínseca durante a realização do procedimento (Engels *et al.*, 1996), o método de Kato-Katz é recomendado pela Organização Mundial de Saúde para o diagnóstico do *S. mansoni* e de outras infecções intestinais por helmintos (WHO, 2008), por ser quantitativo, de fácil execução, necessitar de pouco material e ter uma alta especificidade (Lin *et al.*, 2008).

Nos 125 indivíduos analisados foram encontrados 07 (8,75%) positivos para *S. mansoni*, com apenas um ovo por lâmina. Na primeira lâmina foi encontrado um paciente positivo (14,3%), na segunda também um positivo (14,3%) e na terceira, cinco positivos (71,4%). Esses resultados, em relação a primeira e segunda lâminas, foram similares aos observados por Enk *et al.* (2008) em estudo realizado em Chonim de Cima, Governador Valadares-MG, onde a prevalência encontrada foi de 11,2% quando realizada a leitura de uma lâmina e de 12,5% com duas lâminas. No que diz respeito a porcentagem de detecções na leitura da terceira lâmina, os resultados são divergentes, pois os mesmos encontraram apenas 20,8% de positivos, sendo as duas áreas comparadas de baixa endemicidade.

Ao compararmos os resultados da sorologia com os da coproscopia observamos que os índices de positividade sorológica foram superiores, em mais de quatro vezes, aos índices obtidos pelos métodos parasitológicos de fezes. Nos 125 indivíduos avaliados, 80 (64,0%) foram soropositivos, enquanto apenas 19 (15,2%) foram positivos na coproscopia, sendo essa realizada por três métodos. Essa falta de concordância observada entre os resultados dos métodos imunológicos e os do parasitológico não foi surpreendente.

Em estudos anteriores realizados em áreas de baixa endemicidade, nos quais se compararam os índices de positividade de métodos imunológicos e parasitológico (Dias *et al.*, 1989; Doenhoff *et al.*, 1993; Eltiro *et al.*, 1992), os primeiros foram de duas a seis vezes superiores aos índices de positividade parasitológica. Incluída nessa positividade sorológica há certamente uma parcela de indivíduos que se curaram com o tratamento ou que se expuseram ao parasito, induziram resposta imune, mas não desenvolveram a doença (Oliveira *et al.*, 2003).

A estratégia metodológica mundial atualmente aplicada para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, utilizando o método de Kato-Katz com uma amostra e uma lâmina, para determinar a taxa da infecção não possui a sensibilidade necessária para o diagnóstico, por consequência, os valores de prevalência da esquistossomose, em área de baixa endemicidade, ficam subestimados (Yu *et al.*, 1998).

Estudo realizado em escolares no Egito, por Allam *et al.*, 2009, buscando evidenciar a perda de detecção de casos de esquistossomose em área de baixa intensidade, ao se utilizar o método de Kato-Katz, mostrou que em 11% dos indivíduos que foram negativos pelo Kato-Katz, detectou-se ovos de *S. mansoni* pela técnica de Percoll, e em 23% a técnica de PCR foi positiva. Valendo destacar que, todos os casos positivos no Kato-Katz foram positivos pelo Percoll (Dalton *et al.*, 1997), mas a PCR mostrou alguns resultados negativos, entre os casos considerados positivos pela coproscopia. Sete pacientes com ovos em suas fezes (diagnosticados pelo Percoll) foram perdidos pela PCR.

A sensibilidade dos testes parasitológicos pode ser melhorada através do aumento da quantidade de material fecal e / ou do número de lâminas examinadas. Em estudo realizado em Zhuxi, Qionglai-China, a proporção de positivos pelo Kato-Katz, aumentou de 47% utilizando uma única amostra de fezes, para 68% após análise de sete amostras. No entanto, em condições de campo a realização destes repetidos exames torna-se difícil (Yu *et al.*, 1998).

É importante destacar que os métodos de diagnósticos sorológicos e coproscópicos são complementares (Zhou *et al.*, 2007). Quando se emprega somente o método parasitológico de fezes para diagnosticar a esquistossomose, a prevalência real da

doença fica subestimada, tendo em vista a baixa eficiência deste método para detectar casos com pequeno número de ovos (Engels *et al.*, 1996).

A possibilidade de selecionar previamente os indivíduos a serem submetidos ao exame parasitológico de fezes, pela utilização de uma técnica sorológica comprovadamente mais sensível, permite confirmar a infecção através da insistência do exame parasitológico e assim determinar uma taxa de prevalência mais próxima da realidade (Gargioni *et al.*, 2008).

Apesar da grande variedade de testes imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose existentes, eles apresentam algumas limitações, como, as reações cruzadas que podem ocorrer com outros helmintos, o que faz com que esses testes não sejam específicos. De acordo com estudo realizado no Japão, por Hayashi *et al.*, 2000, o anticorpo anti-*Schistosoma japonicum* foi detectado pelo teste de ELISA, até 33 anos após o tratamento.

Uma revisão de Doenhoff *et al.*, 2004, discute os problemas associados a detecção imunológica da esquistossomose que envolvem principalmente a sensibilidade dos ensaios. Existem duas características que parecem dificultar a padronização dos testes imunológicos. A primeira é a memória imunológica, pois são detectados anticorpos em pacientes com a doença, naqueles que já estão curados da infecção, bem como naqueles que tiveram contato com o parasito, mas não foram infectados. A segunda característica adversa na padronização dos testes imunológicos diz respeito à freqüente semelhança entre os antígenos constituintes dos parasitos (Vaz, 2001).

Em busca de detecção de outros parasitos, além do *S. mansoni*, visando análise de reatividade cruzada, detectamos pelo método de Lutz, 24 dos 125 indivíduos com a presença de outros parasitos. O parasito com maior prevalência foi ancilostomídeo, detectado em 07 indivíduos (5,6%). Dentre os helmintos, observamos que *Trichuris trichiura* foi detectado em 06 indivíduos (4,8%), larvas de *Strongyloides stercoralis*, em 03 indivíduos (2,4%), enquanto *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Giardia lamblia* e *Taenia* sp foram detectados em 01 paciente, cada (0,8%).

Dos 24 indivíduos que apresentaram outros parasitos, 17 foram ELISA reativo, tendo ocorrido nestes, co-infecção por: ancilostomídeo, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *G. lamblia*, *S. stercoralis*, *Taenia* sp e *T. trichiura*. Dados da literatura demonstram a alta freqüência e intensidade de reação cruzada de *S. mansoni* com ancilostomídeo e *A. lumbricoides*. Estudos realizados no Brasil e na Venezuela mostram que os soros de pacientes infectados com esses helmintos apresentam significativa reatividade cruzada com antígenos de *S. mansoni* (Corrêa- Oliveira *et al.*, 1988; Geiger, 2008). Diante disso, é importante a

realização de estudo com as amostras dos 05 indivíduos ELISA reativo, que apresentaram infecção por ancilostomídeos, em busca de analisar possível reatividade cruzada.

A reatividade cruzada entre *S. mansoni* e helmintos intestinais é um comprometimento real para o diagnóstico, porque estes parasitos frequentemente coexistem. Sendo importante esclarecer que essas reações cruzadas podem interferir no diagnóstico sorológico da esquistossomose, mas não obrigatoriamente co-infecção significa reatividade cruzada (Alarco 'n de Noya *et al*, 1996).

O controle da esquistossomose tornou-se possível devido ao desenvolvimento de medicamentos de dose única oral, como oxamniquine e praziquantel, que foram administrados aos pacientes infectados, o que levou a diminuição da morbidade da doença, o que acarretou a necessidade de métodos de diagnóstico mais sensíveis (Gomes *et al.*,2010).

Neste contexto, poucos estudos foram publicados sobre a detecção de DNA do parasita em amostras clínicas. A utilidade da PCR para a detecção de DNA de *S. mansoni* em amostras de fezes humanas foi descrito por Pontes *et al.*, 2002. Embora tenha sido considerada como um método sensível e específico para o diagnóstico de muitas doenças, esta técnica quase não tem sido muito utilizada para demonstrar a presença de DNA de *S. mansoni* em amostras clínicas (Pontes *et al.*,2002).

Um estudo recente foi realizado por Gomes *et al.*,2010, que ao avaliar 206 indivíduos residentes de Pedra Preta, Minas Gerais, área endêmica para esquistossomose, verificou que a prevalência da infecção pelo *S. mansoni* foi de 18%, através do exame de 12 lâminas de Kato-Katz, de uma única amostra de fezes, de cada pessoa, enquanto que a técnica de PCR-ELISA por eles padronizada, para detecção de DNA de *S. mansoni*, determinou uma taxa de infecção de 30%.

Nas 56 amostras que realizamos o diagnóstico molecular para esquistossomose pela técnica de PCR convencional, comparamos os resultados obtidos com os da coproscopia e sorologia. Nas 10 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA reativo para *S. mansoni*, mas sem confirmação parasitológica da esquistossomose e com presença de outros parasitos (Grupo I), observamos que a técnica de PCR detectou 02 (20%) amostras como positivas. A co-infecção nessas amostras foi pelo helminto *Trichuris trichiura*, que de acordo com estudo realizado por Rabello *et al.*, 2002, a reação de amplificação de DNA para *S. mansoni* mostra-se bastante específica, ou seja, não apresenta reação cruzada com o DNA de *T. trichiura*.

No Grupo II, 10 amostras de fezes de indivíduos, que também apresentaram ELISA reativo para *S. mansoni*, mas sem confirmação parasitológica da esquistossomose e

com ausência de outros parasitos, a PCR detectou 04 (40%) amostras positivas. Nesse caso, por não ter acontecido co-infecção por outros parasitos, não existe preocupação em relação a reatividade cruzada.

Nas 07 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA não reativo para *S. mansoni*, com resultados negativos na coproscopia para esquistossomose, mas com presença de outros parasitos (Grupo III), detectamos pela PCR, 01(14,2%) amostra positiva, cuja co-infecção foi com *E. histolytica/dispar*, com a qual não existe relato de existência de reatividade cruzada com *S. mansoni*.

No Grupo IV, 10 amostras de fezes de indivíduos que também apresentaram ELISA não reativo para *S. mansoni*, com resultados negativos na coproscopia para esquistossomose e sem presença de outros parasitos, detectamos também 01(10%) amostra positiva pela PCR. Nesse caso, por não ter acontecido co-infecção por outros parasitos, não existe preocupação em relação a reatividade cruzada.

Diante das limitações da sorologia já citadas, o teste de ELISA vem sendo proposto para ser utilizado em triagem diagnóstica, no Programa de Controle da Esquistossomose (Noya *et al.*,2002). A introdução de métodos sorológicos em estudos epidemiológicos, identificando locais com potencial de infecção, pode contribuir para a redução da transmissão em áreas de baixa endemicidade (Soares *et al.*, 2003).

Nas 19 amostras de fezes de indivíduos que apresentaram ELISA reativa, com presença de ovos de *S.mansoni*, Grupo V, a PCR detectou 13 amostras positivas, enquanto pelo método de Kato-Katz foram detectadas 06 amostras. Comparando os dois resultados verificamos que não se observou a amplificação em 01 das amostras de fezes positivas pelo método de Kato-Katz, amostra essa proveniente de indivíduo que excretou apenas 08 OPG. Mesmo tendo realizado o método de Kato-Katz com leitura de três lâminas, ao invés de uma lâmina, o que é preconizado pela Organização Mundial de Saúde, no Programa de Controle da Esquistossomose, a técnica molecular de PCR detectou 08 amostras que foram negativas pela coproscopia pelo Kato-Katz.

Em estudo realizado por Oliveira *et al.*,2010, com amostras de fezes provenientes de indivíduos da área de baixa endemicidade de Sumidoro-Rio de Janeiro, das 16 amostras que compuseram o grupo de indivíduos com carga parasitária menor que 10 ovos por grama de fezes (OPG), foi possível detectar pela técnica de PCR, com o mesmo par de iniciadores por nós utilizado, 09 amostras positivas, o que representa 56%. Já no nosso estudo, das 19 amostras analisadas, detectamos 13 positivas pela PCR, equivalente a 68,4%.

Como já relatado, em áreas onde os esforços para o controle da esquistossomose levaram a redução da carga parasitária dos indivíduos, os métodos parasitológicos clássicos não demonstram sensibilidade suficiente para o diagnóstico da doença (Noya *et al.*, 2002). Isso torna necessário, desenvolvimento de novas técnicas para diagnóstico da esquistossomose, que visem superar esta limitação (Lin *et al.*, 2008). Sistemas mais sensíveis de detecção de ovos são desejáveis como método de diagnóstico definitivo. Como os ovos de *S. mansoni* são grandes e tem forma peculiar, com espículo lateral, são facilmente reconhecidos quando visualizados ao microscópio, o que garante um diagnóstico definitivo com poucas possibilidades de resultados falso-negativos.

O aumento da quantidade de fezes ou do número de amostra ou do número de lâminas lidas, bem como o uso de métodos de concentrações fecais diferenciados, foram testados a fim de melhorar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico, mas nenhuma destas abordagens tem sido suficientemente convincente para justificar a sua extensa utilização (Eberl *et al.*, 2002).

Neste contexto, o método do Gradiente Salínico e o Helmintex<sup>®</sup>, fazem parte dessas novas técnicas alternativas para o diagnóstico da esquistossomose, foram realizadas em outra etapa da pesquisa do qual esse estudo faz parte e os resultados serão por nós analisados, em comparação com a técnica molecular de PCR.

Ao analisarmos os resultados obtidos pelo método do Gradiente Salínico nas 17 amostras de fezes analisadas do Grupo V, encontramos 09 (52,9%) indivíduos positivos para o *S. mansoni*. Nessa amostragem a técnica de PCR detectou 11 amostras positivas (64,7%). Comparando os dois resultados verificamos que não se observou a amplificação em 02 (1,2%) das amostras de fezes positivas pelo Gradiente Salínico, provenientes de indivíduos que excretaram 02 OPG, ambas. Já 04 (2,4%) amostras foram positivas na PCR, mas o método do Gradiente Salínico não as detectou. Dessas, 02 foram negativas também pelo Kato-Katz, e as 02 outras foram positivas, com carga parasitária de apenas 08 OPG, ambas. Diante disso, verificamos que a técnica de PCR se mostrou mais sensível que a coproscopia tanto pelo Gradiente Salínico, quanto pelo Kato-Katz, valendo ressaltar que houve falha na detecção de algumas amostras, em ambos os métodos.

O método do Gradiente Salínico está em fase de aperfeiçoamento, conforme recomendações da WHO (2006), para ser utilizado como ferramenta de diagnóstico da esquistossomose. Pesquisas de campo adicionais estão em andamento para validar seu uso em estudos populacionais. Um das suas vantagens é capacidade de armazenamento das fezes em

formol a 10%, por pelo menos 60 dias antes das análises, facilitando a realização de grandes levantamentos epidemiológicos (Coelho *et al.*, 2009).

Um aspecto importante é que ao compararmos o número de lâminas necessárias para ler-se todo o sedimento produzido pelo Gradiente Salínico, o qual utiliza 500mg de fezes, com o número de lâminas necessárias para a leitura dessa mesma quantidade de fezes através do método de Kato-Katz. Enquanto pelo Kato-Katz, necessita-se de leitura, em média, de 07 lâminas, pelo Gradiente Salínico, são 12 lâminas (Pinheiro,2010), o que aumenta o tempo de execução desta técnica.

Quanto ao método do Helmintex<sup>®</sup>, proposto por Teixeira *et al.*,2007, visando a identificação de ovos de *S. mansoni* em 30 gramas de fezes processadas através de uma seqüência de sedimentações espontâneas e tamisações, para em seguida, os ovos serem isolados através da interação com esferas paramagnéticas e visualizados ao microscópio, realizou-se um estudo utilizando amostras semeadas em laboratório com ovos recuperados de camundongos infectados por *S. mansoni*, e mostrou-se que a sensibilidade desta técnica foi de 100% quando a carga parasitária era de 1,3 OPG, decaindo para 25% de sensibilidade quando era de 0,1 OPG (Teixeira *et al.*, 2007).

Ao analisarmos os resultados obtidos pelo método do Helmintex<sup>®</sup> nas 13 amostras de fezes do Grupo V analisadas, encontramos 10 (76,9%) indivíduos positivos para o *S. mansoni*. Nessa amostragem, a técnica de PCR detectou 08 amostras (61,5%). Comparando os dois resultados verificamos que não se observou a amplificação em 03(23,0%) das amostras de fezes positivas pelo Helmintex<sup>®</sup>, provenientes de indivíduos que excretaram menos que 0,4 OPG, sendo essas detectadas apenas pelo Helmintex<sup>®</sup>. Já 01 amostra (7,6%) foi positiva na PCR, mas o método do Helmintex<sup>®</sup> não a detectou. Essa amostra não foi detectada pelo método do Kato-Katz, mas apresentou carga parasitária de 10 OPG pelo método do Gradiente Salínico. Mais uma vez observamos que aconteceu falha na detecção de algumas amostras em todos os métodos realizados.

É importante ressaltar que no estudo realizado por Pinheiro, 2010, onde se realizou a comparação de três métodos coproscópicos para diagnóstico da esquistossomose, em área de baixa endemicidade, a maior prevalência encontrada foi obtida pelo método do Helmintex<sup>®</sup>, sendo de 47,1%, visto que o resultado do método de Kato-Katz foi de 8,75% e o do Gradiente Salínico foi 18%. Este foi o primeiro estudo realizado com o método de Helmintex<sup>®</sup> em inquérito epidemiológico.

A exigência de uma grande quantidade de fezes para realização do Helmintex<sup>®</sup>, torna-se um fator limitante dessa técnica, devido ao fato de que a maioria dos indivíduos,

mesmo que avisados da necessidade de coletar uma grande quantidade de material não o faz. E também por causa dessa grande quantidade de fezes, necessita-se de várias lavagens, para a obtenção de um sobrenadante límpido, o que aumenta o tempo despendido para a realização da técnica, tornando-a demorada (Pinheiro, 2010). Este é um método laborioso, relativamente caro e exige equipamentos específicos, porém a redução do volume total de fezes e a concentração final de ovos no sedimento, devido a utilização de esferas paramagnéticas (Gunderson *et al.*, 1992), parece ser fundamental para o sucesso do método do Helmintex<sup>®</sup> (Teixeira *et al.*, 2007).

Além das técnicas coproscópicas mais recentes, a detecção de seqüências específicas de DNA pela PCR tem se mostrado extremamente valiosa para o diagnóstico de uma variedade de agentes patogênicos das doenças infecciosas (Leal *et al.*, 1996, Lucena *et al.*, 1998, Schindler *et al.*, 2001, Rodrigues *et al.*, 2002). No entanto, a detecção de DNA de *S.mansoni* é rara, apesar de existir recomendação Organização Mundial de Saúde que pesquisas sobre novas estratégias e ferramentas para controle da esquistossomose seja um dos principais focos (WHO, 2004).

A especificidade deste teste foi demonstrada pela ausência de amplificação de DNA, quando teste foram realizados em amostras de indivíduos com esquistossomose e co-infecção com outros helmintos como: ancilostomídeo, *A. lumbricoides*, *Taenia solium* e *T. trichiuria* (Pontes *et al.*, 2003).

A determinação da infecção através da detecção de DNA de *S. mansoni* nas fezes de indivíduos soropositivos representa uma nova forma de confirmar os resultados de IgG-ELISA para esquistossomose. Portanto, os estudos neste sentido devem ser estimulados e ampliados (Oliveira *et al.*, 2010). Para um análise mais abrangente, as 56 amostras analisadas pela PCR podem ser separadas em relação a reatividade ao teste de ELISA, em dois grupos: Amostras ELISA não reativo (17 amostras) e Amostras ELISA reativo (39 amostras).

Dentre as 17 amostras desse primeiro grupo, a PCR detectou duas amostras positivas, o que sugere uma maior sensibilidade da técnica molecular em relação a sorológica, sendo importante observar a possibilidade de contaminação das amostras ou da reação, o que é possível acontecer mesmo que o experimento tenha sido realizado em duplicata e com todas as condições devidamente controladas, uma vez que inclusive métodos físicos, como a separação de salas para cada etapa e materiais especificos para essas salas, o uso de jalecos descartáveis, luvas de látex, limpeza das bancadas e pipetas com álcool 70% e câmara de fluxo laminar com luz ultra violeta, foram utilizados durante o processo, para minimizar a possibilidade de contaminação. Nesses casos sugeriu-se a coleta de mais amostras de fezes dos

indivíduos para busca exaustiva da visualização do ovo pelas técnicas coproscópicas de rotina.

Dentre as 39 amostras de fezes do segundo grupo, 19 foram positivas pela PCR. Dessa forma pela técnica molecular podemos comprovar a presença real de DNA do parasito nessas amostras, indicando-se infecção ativa em 48,7% das amostras soropositivas. Sugerindo-se que aproximadamente metade das amostras reativas pelo ELISA se enquadram em dois casos: 14 amostras devem se tratar de reatividade cruzada ou infecção passada e 06 amostras não foram detectadas pela PCR por falta de sensibilidade da técnica, pois são comprovadamente positivas, uma vez que a coproscopia por um ou mais dos métodos foi positiva.

Nesses casos, o que pode ter acontecido é que a alíquota de fezes utilizada poderia não conter a mínima quantidade necessária de ovo do parasito para obtenção de DNA na etapa de extração, uma vez que são amostras provenientes de indivíduos de área de baixa endemicidade, ou seja, com pequena carga parasitária e também devido a variação na produção de ovos e consequente distribuição desigual desses nas fezes, o que é minimizado com homogeneização das mesmas, entretanto nada impede de que a alíquota utilizada para coproscopia leve os poucos ovos existentes.

De acordo com a literatura, a PCR pode detectar DNA em amostras de fezes de indivíduos com eliminação de até 2,4 OPG (Hamburger *et al.*, 1991). Das 06 amostras que não foram detectadas pela PCR, apenas 01 foi positiva pelo Kato-Katz, apresentando 8 OPG, 02 foram positivas no Gradiente Salínico, com 2 OPG e as outras 03 foram positivas apenas no Helmintex<sup>®</sup>, com 0,10; 0,20; 0,30 OPG. O material dessas amostras foi também submetido ao teste de inibidores com a finalidade de verificar possível inibição da PCR, já que um exame negativo nem sempre indica ausência do DNA de *S. mansoni*, pode indicar a presença de inibidores da PCR, fato que ocorreu com duas das seis amostras negativas, que não amplificaram mesmo após o “spiking”.

Nas 19 amostras que compuseram o Grupo V, a prevalência de *S. mansoni*, obtida pela técnica de Kato-Katz, com a leitura de três lâminas foi de 31,6%. Enquanto a prevalência observada pela técnica de PCR foi 68,4%, ou seja, maior que o dobro da prevalência determinada, pela técnica de Kato-Katz. Esse dados diferem dos obtidos por Pontes *et al.*, 2003, em estudo realizado na localidade de Comercinho-Minas Gerais, onde obtiveram uma menor diferença entre as prevalências da coproscopia com a técnica de PCR, sendo de 30,9% pela coproscopia para 38,1%, pela PCR, ou seja, a PCR foi 0,8 vezes superior. Isso deve-se possivelmente a utilização de 03 amostras de fezes na análise coproscópica desse estudo.

Quando comparamos as amostras do Grupo V, em relação aos resultados obtidos pelo Gradiente Salínico e pelo método do Helmintex<sup>®</sup>, com aqueles obtidos pela PCR, verificamos que a proporção de detecções pelo Gradiente Salínico foi de 52,9%, pelo Helmintex<sup>®</sup> de 76,9% , enquanto que pela PCR foi de 68,4%. Assim, a proporção de detecções pela técnica de PCR foi 1,3 vezes maior do que a pelo Gradiente Salínico, ou seja, mais efetivo na detecção de casos na localidade em estudo. E foi 1,1 vezes menor do que a detecção pelo Helmintex<sup>®</sup>. Porém, como já descrito, houve amostras que ovos de *S. mansoni* foram detectados por apenas um desses métodos, sugerindo a importância da realização conjunta dos mesmos.

A técnica de PCR possui alta sensibilidade e especificidade para a detecção de DNA de *Schistosoma* sp, mas sua utilização em levantamentos epidemiológicos tem sido limitada, devido a extração de DNA e a posterior amplificação pela PCR terem sido, por um bom tempo, considerados trabalhosos e caros. No entanto, avanços nos procedimentos de isolamento de DNA e na técnica de PCR, tem tornado essa uma alternativa viável em relação aos métodos de diagnóstico baseados em análises microscópicas (Verweij *et al.*, 2004).

A análise de 67 amostras de fezes, provenientes de indivíduos de Chonim de Cima-Minas Gerais, uma área endêmica para esquistossomose, estudo realizado por Gomes *et al.*,2009, confirmou que alterações no método de extração de DNA, incluindo a utilização de um kit comercial disponível, QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden,Alemanha), e a inclusão de medidas adicionais de controle de qualidade, como: separação de salas e materiais e o uso de câmara de fluxo laminar com luz UV, aumentam a sensibilidade da técnica de PCR. A proporção de positividade observada pela técnica de PCR (61,2%) foi maior do que a verificada com o exame de seis lâminas pela técnica de Kato-Katz (41,8%).

No nosso estudo, a comparação da sensibilidade do processo de extração, realizada em 17 das amostras testadas pela PCR, mostrou uma maior sensibilidade da técnica de extração de DNA pelo método comercial do Kit Fast DNA, quando comparada ao protocolo de Santos *et al.*,2007. Como mostrado em estudo realizado por Talal *et al.*,1998, a sensibilidade da detecção de DNA de parasitos, em amostras de fezes depende muito do método utilizado para a extração de DNA. Um procedimento eficiente para extração de DNA de fezes deve libertar o DNA do parasito a partir de esporos, ovos ou cistos; impedir a absorção de DNA constituintes das fezes e remover os inibidores da PCR.

De acordo com estudo de Rinder *et al.*,1998, cada método de extração apresenta vantagens e desvantagens em termos de tempo consumido no processamento das amostras, o

uso de substâncias tóxicas e produtos químicos, e a pureza final do DNA. Vale ressaltar que, uma complicação adicional para todos os procedimentos para extração de DNA de fezes é a não uniformidade inerente das amostras de fezes, que podem variar muito em sua composição, dependendo da dieta, do estado de saúde, e da flora intestinal do paciente (Silva *et al.*,1999).

Apesar dos preços de equipamentos e reagentes serem cada vez mais atraentes, o custo da PCR e a necessidade de equipamentos sofisticados, são ainda limitantes do uso de rotina dessa técnica em laboratórios (Noya *et al.*,2002). Porém, a PCR não se destina a um diagnóstico de rotina, nos países endêmicos para *Schistosoma* sp. De acordo, com estudo realizado por ten Hove *et al.*,2008, o que se sugere sobre a PCR para diagnóstico da esquistossomose, é que essa técnica deve ser utilizada como uma poderosa ferramenta alternativa ou complementar de diagnóstico para os centros de pesquisa desses países.

## 6. CONCLUSÕES

---

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

1. Os resultados do método de ELISA podem ser confirmados, para assegurar infecção ativa por *S. mansoni*, pela realização de técnicas coproscópicas que permitem visualização direta do ovo, e/ou pela realização da técnica de PCR para detecção de DNA do parasito.

2. A técnica de PCR para detecção de ovos de *Schistosoma mansoni* em fezes se mostrou mais sensível que a abordagem parasitológica convencional, pelo método de Kato-Katz, mesmo esse tendo sido realizado com a leitura de três lâminas.

3. É indispensável a associação dos vários métodos de diagnóstico disponíveis, com intuito de detectar a prevalência real da doença. Sendo importante ressaltar que nenhum dos métodos realizados apresentou 100% de sensibilidade, tendo sido observado que o método do Helmintex<sup>®</sup> mostrou-se o mais eficaz na detecção de portadores da esquistossomose.

4. A PCR constitui mais uma ferramenta de diagnóstico importante para melhorar a sensibilidade na detecção da esquistossomose mansoni, principalmente em indivíduos provenientes de áreas de baixa endemicidade, sendo importante observar que quando o objetivo é o controle da doença, o custo da técnica molecular é compatível aos benefícios obtidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abath, F.G. *et al.* Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.

Abbasi, I.; Branzburg, A.; Campos-Ponce, M.; Abdel Hafez, S.K.; Raoul, F.; Craig, P.S. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. **Am J Tropic Med Hygiene** , v.69, p.324–30, 2003.

Abu Al-Soud, W.; Johnsson, L.J.; Rådstro, P. M. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.345–350, 2000.

Alarcon de Noya, B. *et al.* The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 139-146, 1999.

Alarcón de Noya, B.; Colmenares, C.; Losada, S.; Fermin, Z.; Masroua, G.; Ruiz, L.; Soto, L.; Noya, O. Do intestinal parasites interfere with the seroepidemiologic surveillance of *Schistosoma mansoni* infection? **Epidemiol. Infect.**, v.116, p. 323–329,1996.

Allam, A.F.; Kader, O.; Zaki, A.; Shehab, A.Y.; Farag, F. Assessing the marginal error in and PCR tecnic. **Trop. Med. Int. Health**, v.14, p.316-321, 2009.

Almeida, Y. M. de. Esquistossomose mansônica no Ceará: Notas bibliográficas, 1920 a 1977. **Rev. de Med. da UFC**, v. 39, n. 1/2, p. 18-20, 1999.

Barbosa, C. S.; Silva, C. B. Epidemiologia da esquistossomose mansônica no Engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Publica**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 83-87, 1992.

Barreto, M. L.; Smith, D. H.; Sleight, A. C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 84, n. 4, p. 554-555, 1990.

Behrman,A.J. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/788867-overview>>. Acessado em: 13 Apr. 2008.

Bergquist, R.; Johansen, M.V.; Utzinger, J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? **Trends Parasitol**, v.25, p.151-156, 2009.

Bierman, W.E.W.; Wetsteyn, J.C.F.M.; Van Gool, T. Presentation and diagnosis of imported schistosomiasis: relevance of eosinophilia, microscopy for ova, and serology. **Journal of Travel Medicine**, v.12, p. 9–13, 2005.

Bottieau, E.; Clerinx, J.; de Vega, M.R.; Van den Enden, E.; Colebunders, R.; Van Esbroeck, M.; Vervoot, T.; Van Gompel, A.; Van den Ende, J. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. **Journal of Infection**, v.52, p. 339–345, 2006.

Butterworth, A.; Dunne, D.; Fulford, A.; Capron, M.; Khalife, J.; Capron, A.; Koech, D.; Ouma, J.; Sturrock, R. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anticarbohydrate antibodies block the expression of immunity. **Biochimie** v.70, p.1053–1063, 1988.

Camargo, S. 1979. Impacto do desenvolvimento na expansão da esquistossomose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.22, p. 117-119, 1979.

Carvalho, O. S. *et al.* Re-evaluation of Schistosomiasis mansoni in Minas Gerais, Brasil II Alto Paranaíba Mesoregion. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 141-142, 1997.

Carvalho, Omar dos S. (Org.); Coelho, Paulo M. Z. (Org.) & Lenzi, Henrique L. (Org.). **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008.

Chesky, M. *et al.* Diagnóstico molecular das infecções do Sistema Nervoso Central pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 131-136, 1998.

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

Coelho, P. M. Z.; Jurberg, A. D.; Oliveira, A. A.; Katz, N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 720-723, 2009.

Colley, D. G.; Hieny, S. E.; Bartholomew, R. K.; Cook, J. A. Immune Response During Human Schistosomiasis Mansoni. Iii. Regulatory Effect Of Patient Sera On Human Lymphocytes Blastogenic Responses To Schistosomal Antigen Preparations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 917, 1977.

Corachan, M. Schistosomiasis and international travel. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 446-450, 2002.

Corrêa-Oliveira, R.; Dusse, L.M.S.; Viana, I.R.C.; Colley, D.G.; Carvalho, O.S.; Gazzinelli, G. Human antibody responses against schistosomal antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.38, p.348–355, 1988.

Curtale, F.; Mohamed, M. Y.; Youssef, Z. M. Comprehensive primary health care, a viable strategy for the elimination of schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, n. 1, p. 70-72, 2010.

CVE. Centro de Vigilância epidemiológica. Esquistossomose mansoni. **Informe técnico**, São Paulo, 2009. Disponível em: [http:// www.cve.sp.gov.br](http://www.cve.sp.gov.br).

Da Frota, S. M.; Carneiro, T. R. ; Queiroz, J. A. N.; Alencar, L. M. ; Heukelbach, J.; Bezerra, F.S.M. Combination of Kato Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. **Acta Tropica**, p. 1-4, 2010.

Dalton, J.P.; Day, S.R.; Drew, A.C; Brindley, P.J. A method for the isolation of Schistosome eggs and miracidia free of contamination host tissues. **Parasitology**. v.115, p.29–32,1997.

De Clerq, D. *et al.* Assessment of cure by detection of circulating antigens in serum and urine, following schistosomiasis mass treatment in two villages of the Office du Niger, Mali. **Acta Tropica**, v. 68, n. 3, p. 339-346, 1997.

De Jesus, A. R; Silva, A.; Santana, L. B.; Magalhães, A.; De Jesus, A. A.; De Almeida, R. P; Rêgo, M. A V.; Burattini, M. N.; Pearce, E. J.; Carvalho, E. M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

De Jonge, N. *et al.* Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 591-594, 1988.

De Jonge, N. *et al.* Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 756-759, 1991.

De Vlas, S.J.; Gryseels, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitol Today**, v.8, p.274-277,1992.

Deelder, A. M. *et al.* Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infection by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Tropical and Geographical Medicine**, Amsterdam, v. 46, n. 4, p. 233-238, 1994.

Deelder, A. M. *et al.* *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. **Experimental Parasitology**, New York, v.50, n. 1, p. 16-32,1980.

Dias Neto, E.; Harrop R.; Correia-Oliveira, R.; Pena, S.D.J.; Wilson, R.A.; Simpson, A.J.G. The schistosome genome project: RNA arbitrarily primed PCR allows the accelerated generation of expressed sequence tags. **Mem Inst Oswaldo Cruz** ,v.91, p.655–657,1996.

Dias, L. C. S. *et al.* Field trials for immunodiagnosis with reference to *Schistosoma mansoni*. In: Bergquist, N. R. (Org.). **Immunodiagnostic Approaches in Schistosomiasis**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 39-47, 1992.

Dias, L.C.S.; Kawazoe, U.; Glasser, C.M.; Hoshino-Shimizu, S.; Kanamura, H.Y.; Cordeiro, J.A.; Guarata, O.F.; Ishirata, G.J. Schistosomiasis mansoni in the municipality of Pedro de Toledo (São Paulo, Brazil) where the *Biomphalaria tenagophila* is the snail host: I. Prevalence in human population. **Rev Inst Med Trop**, v.31, p. 110 -118,1989.

Doenhoff, M.J.; Butterworth, A.E.; Hayes, R.J.; *et al.* Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** , v. 87, p. 42-8,1993.

Doenhoff, M.J.; Chiodini, P.L.; Hamilton, J.V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends Parasitol.**, v.20, p.35-39, 2004.

Eberl, M.; Al-Sherbiny, M.; Hagan, P.; Ljubojevic, S.; Thomas, A.W.; Wilson, R.A. A novel and sensitive method to monitor helminth infections by faecal sampling. **Acta Tropica**, v. 83, p.183–187, 2002.

Ebrahim, A. *et al.* Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.57, n. 6, p. 706-708, 1997.

Eisenstein, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.322, n. 3, p. 178-183, 1990.

Eltiro, F.; Ye- Ebiyo, Y. & Taylor, M. G. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using *Shistosoma mansoni* soluble egg antigen as a diagnostic tool for *Shistosoma mansoni* Ethiopian schoolchildren. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.52-56,1992.

Engels, D.; Sinzinkayo, E.;Gryseels, B. Day-to-Day Egg Count Fluctuation in *Schistosoma mansoni* Infection and its Operational Implications.**Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, n. 4, p. 319-324, 1996.

Enk, M.J.; Lima, A.C.; Massara, C.L.; Coelho, P.M.; Schall, V.T. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.78, p. 140–146,2008.

Erlich, G.D.; Greenberg, S. J. PCR- bases diagnosis in infectious disease. **Blackwell Scientific Publications**, 1994.

Erlich, H. A.; Gelfand, D.; Sninsky, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 252, n. 5013, p. 1643-1651, 1991.

Favre, T. C. *et al.* Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 5, p. 565-567, 1995

Feder, I.; Nietfeld, J.C.; Galland, J. *et al.* Comparison of cultivation and PCR hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.2477-2484, 2001.

Feldmeier, H.; Buttner, D.W. Immunodiagnosis of Schistosomiasis haematobium and schistosomiasis mansoni in man. Application of crude extracts from adult worms and cercariae in the IHA and the ELISA. **Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A**, v. 255, p.413-421, 1983.

Files, V.S. A study of the vector-parasite relationships in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v.41, p.264-9, 1951.

Franco, G.R.; Valadao, A.F.; Azevedo, V.; Rabelo, E.M. The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. **Int.J.Parasitol.** v.30, p.453-463, 2000.

Garcia, M.M.A.; Amorim, M.N.; Viana, L.G.; Katz, N.; Rabelo, A.L.T. Detection of anti-*Schistosoma* antibodies in oral fluids. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.90, p.513,1995.

Gargioni, C.; Da Silva, R. M.; Thomé, C. M.; Quadros, C. M. da S.; Kanamura, H. Y. Utilização de método sorológico como ferramenta diagnóstica para implementação da vigilância e controle da esquistossomose no Município de Holambra, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 373-379, 2008.

Gasser, R.B.; Morahan, G.; Mitchell, G.F. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by Polymerase Chain Reaction. **Mol Biochem Parasitol**, v.47, p. 255–258, 1991.

Geiger, S.M. Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in endemic populations co-infected with soil-transmitted helminths: Present knowledge, challenges, and the need for further studies. **Acta Tropica**, v. 108, p. 118–123, 2008.

Gelfand, D. H. Taq DNA Polimerase. In: Erlich, H. A. (Org.), PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. **Stockton Press, New York**, p. 17-22, 1989.

Gomes, L.I.; Marques, H.S.; Enk, M.J.; Coelho, P.M.Z.; Rabelo, A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.10, p.1194–1196, 2009.

Gomes, L.I.; Marques, L.H.S.; Enk, M.J.; Oliveira, M.C.; Coelho, P.M.Z.; Rabello, A. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of *Schistosoma* Infection in Feces. **Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)**, Minas Gerais, 2010.

Gonçalves, M. M. L.; Barreto, M. G. M.; Peralta, R. H. S.; Gargioni, C.; Gonçalves, T.; Igreja, R. P.; Soares, M. S.; Peralta, J. M. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. **Acta Tropica**, v. 100, p. 24-30, 2006.

Gonçalves, M. M. L.; Barreto, M. M. G.; Maldonado, J.R.; A.; Maione, V. R.; Rey, L.; Soares, M. S. Fatores sócio-culturais e éticos relacionados com os processos de diagnósticos da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 92-100, 2005.

Gryseels, B.; De Vlas, S. J. Worm burdens in schistosome infections. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 115-119, 1996.

Gryseels, B.; Polman, K.; Clerinx, J.; Kestens, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v.368, p.1106-1118, 2006.

Guimarães, I. C. S.; Tavares-Neto, J. Transmissão urbana de esquistossomose em crianças de um bairro de Salvador, Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 5, p. 451-455, 2006.

Gundersen, S. G.; Haagensen, I.; Jonassen, T. O.; Figenschau, K. J.; De Jonge, N.; Deelder, A. M. Magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. **J. Immunol. Methods**, v. 148, p. 1-8, 1992.

Hamburger, J. *et al.* A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 6, p.872-876, 1998.

Hamburger, J.; Turetski, T.; Kapeller, I.; Deresiewicz, R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. **Mol Biochem Parasitol**, v. 44, p.73-80, 1991.

Hanelt, B. *et al.* Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 387-394, 1997.

Hayashi, S.; Ohtake, H.; Koike, M. Laparoscopic diagnosis and clinical course of chronic schistosomiasis japonica. **Acta Tropica**, v.77, p. 133-140, 2000.

Hertel, J.; Haberl, B.; Hamburguer, J. H. W. Description of a tandem repeated DNA sequence of *Echinostoma caproni* and methods for its detection in snail and plankton samples. **Parasitology**, London, v. 126, p. 443-449, 2003.

Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Ehrlich Sachs, S.; Sachs, J.D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Med.** v.3, e.102, 2006.

Houston, S.; Kowalewska-Grochowska, K.; Naik, S.; McKean, J.; Jonson, E.S.; Warren, K. First report of *Schistosoma mekongi* infection with brain involvement. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.6, 2004.

Innis, M. A; Gelfand, D. H. Optimization on PCRs. In: INNIS, M. A. (Org.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, cap. 1, 1990.

Jannotti-Passos, L. K. *et al.* PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 395-399, 1997.

Jauréguiberry, S.; Ansart, S.; Perez, L.; Danis, M.; Bricaire, F.; Caumes, E. Acute neuroschistosomiasis: two cases associated with cerebral vasculitis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 5, p. 964-966, 2007.

Johnston, A.; Kane, R. A.; Rollinson, D. Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. **Parasitology**, London, v. 107, p.147-156, 1993.

Jurberg, A.D.; Oliveira, A.A.; Lenzi, H.L.; Coelho, P.M.Z. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, p. 112-114, 2008.

Kato-Hayashi, N.; Kirinoki, M.; Iwamura, Y.; Kanazawa, T.; Kitikoon, V.; Matsuda, H. Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction. **Exp Parasitol**, v. 124(3), p. 325-329, 2010.

Katz, N. & Almeida, K. Esquistossomose, Xistose, Barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.

Katz, N. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 69-71, 2008.

Katz, N.; Chaves, A.; Pellegrino, J. P. A simple device for quantitative stool thick-smear in *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 14, p. 397-400, 1972.

Kiang, D.; Karim, A.M.; LoVerde, P.T. Cloning the gene encoding *Schistosoma mansoni* p50, an immunophilin. **Gene**, v.170, p. 137-140, 1996.

Kleppe, K. *et al.* Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 56, n. 2, p. 341-361, 1971.

Kuhl, S. J.; Tang, Y.J.; Navarro, L.; Gumerlock, P.H.; Silva, J. Diagnosis and monitoring of *Clostridium difficile* infections with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p.S234–S238, 1993.

Lage, A. P. *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of the *cagA* gene in gastric biopsy specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2752-2756, 1995.

Le, T.H.; Blair, D.; Agatsuma, T.; Humair, P.F.; Campbell, N.J.; Iwagami, M.; Littlewood, D.T.; Peacock, B.; Johnston, D.A.; Bartley, J.; Rollinson, D.; Herniou, E.A.; Zarlenga, D.S.; McManus, D.P. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders—a cautionary tale from the parasitic flatworms. **Mol Biol.**, v.17, p.1123–5, 2000.

Leal, N.C.; Abath, F.G.C.; Alves, L.C.; de Almeida, A.M. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Rev Inst Med Trop**, v.38, p. 371-373, 1996.

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.**, v. 57, n. 3, p. 281-286, 2008.

Lucena, W.A.; Dhalia, R.; Abath, F.G.C.; Nicolas, L.; Regis, L.N.; Furtado, A.F. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from microfilaraemic patients. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, p. 290-293, 1998.

Lutz, A. *Schistosoma mansoni* e a Schistosomatose, segundo observações, feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.11, n.1, p.121-125, 1919.

Martinez, E. M.; Neves, R. H.; Oliveira, R. M. F. de; Machado-Silva, J.R. & Rey, L. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus Musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 557-564, 2003.

Maurer, R. L. **Caracterização morfológica e análise por microssatélites de DNA de isolados de campo do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, obtidos em Esteio, Rio Grande do Sul**, 2005. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Curso de Zoologia, Faculdade de Biociências, Porto Alegre, 2005.

McManus, D.P.; Hope, M. Molecular variation in the human schistosomes. **Acta Trop.** v.53, p.255-276, 1993.

Melo, A. L. de; Coelho, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: **Parasitologia Humana**. 11ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 494, 2005.

Melo, F. P. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni***. 114p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

Miller, P.; Wilson, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, London, v. 77, n. 3, p. 281-302, 1978.

Molyneux, D.H.; Hotez, P.J.; Fenwick, A. “Rapid-impact interventions”: how a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. **PLoS Med.** v.2, p.1064–1070, 2005.

Mountford, A. P. Immunological aspects of schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 27, n. 7/8, p. 243-246, 2005.

Mullis, K. B.; Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

Noya, B.A.; Balzan, C.; Artega, C.; Cesari, I.; Noya, O. The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features an evolution. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, p. 136-146, 1999.

Noya, O.; Alarcón de Noya, B.; Losada,S.; Colmenares, C.; Guzmán, C.; Lorenzo,M.A; Bermúdez,H. Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis in Areas of Low Transmission. A Review of a Line of Research. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 167-169, 2002.

Noya, B.A.; RuizGuevara, 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** , v.101, p. 29-35,2006.

Oliveira, E.J.; Kanamura, H.Y.; Dias, L.C.S; Soares, L.C.B; Lima, D.M.C; Ciaravolho, R.M.C. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p.255-261, 2003.

Oliveira,L.M.A.; Santos,H.L.C.; Gonçalves,M.M.L.; Barreto, M.G.M.; Peralta, J.M. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Article in press.,2010.

Olson, P.D.; Cribb,T.H.; Tkach, V.V.; Bray, R.A.; Littlewood, D.T.J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda), **International Journal for Parasitology**, v.33, 733–755, 2003.

Pepe, M. S.; Carvalho, O. S.; Caldeira, R.L.; Passos, L. K. J.; Muller, G.; Rodrigues, A. P.; Amaral, H. L. C.; Berne, M. E. A. Identificação de espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) na Região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso de Iniciação

Científica da UFPEL, Pelotas, 2006. **Anais do 15º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas: Editora da UFPEL, 2006.

Pessoa, S. B.; Martins, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1982.

Pinheiro, M.C.C. **Avaliação de três métodos coproscópicos para diagnóstico da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade no estado do Ceará. 2010.** Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

Pinheiro, S.M.B. *et al.* Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of northeastern Brazil by a Polymerase Chain Reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, n. 2, p. 221-224, 2004.

Pontes, L. A.; Dias-Neto, E.; Rabello, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, n. 2, p. 157-162, 2002.

Pontes, L.A.; Oliveira, M.C.; Katz, N.; Dias-Neto, E.; Rabello, A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **Am J Tropic Med Hygiene** v.68, p.652–656, 2003.

Pontes, R. J. S.; Nations, S.; Marilyn, K; Ardo, C. P.; Fernandes, M. D. D.; Lima, M. T.; Sousa, S. P; Silva, R. S. & Fernandes, S. M. D. Esquistossomose no Estado do Ceará (Parte D): Evolução das ações de controle e delimitação da área endêmica, 1977 – 1994. **Rev. Med. UFC**, v. 39, n. 1/2, p. 21 – 36, 1999.

Powell, H. A.; Gooding, C.M.; Garrett, S.D.; Lund, B.M.; McKee, R.A. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.18, p.59–61, 1994.

Prata, A. Esquistossomose mansônica. In: VERONESI, R & FOCACCIA, R. **Doenças Infeciosas e Parasitárias**, 2ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 838-855, 2002.

Rabello, A.; Pontes, L.A. & Dias-Neto, E. Recent advances in the diagnosis of *Schistosoma* infection: the detection of parasite DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.171–172, 2002.

Rabello, A.; Pontes, L.A.; Enk, M.J.; Montenegro, S.M.L.; Morais, C.N.L. Diagnóstico Parasitológico, Imunológico e Molecular da Esquistossomose Mansoni. In: Carvalho, O. S.; Coelho, P. M. Z.; Lenzi, H. L.(Org.) **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 897-925, 2008.

Rabello, A.L.; Rocha, R.S.; Oliveira, J.P.; Katz, N.; Lambertucci, J.R. Stool examination and rectal biopsy in the diagnosis and evaluation of therapy of schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop**, v.34, p. 601–608, 1997.

Rey, L. *Schistosoma* e esquistossomose: epidemiologia e controle. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia**, 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.455-479, 2001.

Rinder, H.; Janitschke, K.; Aspöck, H.; Silva, A.; Deplazes, P.; Fedorko, D.P.; Futh, U.; Hüniger, F.; Lehmacher, A.; Meyer, C.G.; Molina, J.M.; Sandfort, J.; Weber, R.; Löscher, T. Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 1814-1818, 1998.

Rodrigues, E.H.G.; Brito, M.E.F.; Mendonça, M.G.; Werkhäuser, R.P.; Coutinho, E.M.; Souza, W.V.; Albuquerque, M.F.P.M.; Jardim, M.L.; Abath, F.G.C. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, v.40, p. 3572-3576, 2002.

Russomando, G.; Figueiredo, A.; Almiron, M.; Sakamoto, M.; Morita, K.; Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. **J Clin Microbiol**, v.30, p. 2864–2868, 1992.

Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1985.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York. **Cold Spring Harbor Press**, 957p, 1989.

Sandoval, N.; Siles-Lucas, M.; Perez-Arellano, J.L.; Carranza, C.; Puente, S.; Lopez- Aban, J.; Muro, A. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. **Parasitology** v.133, p.581-587, 2006.

Santos, H.L.C.; Peralta, R.H.S.; Macedo, H.W.; Barreto, M.G.M.; Peralta, J.M. Comparison of Multiplex-PCR and Antigen Detection for Differential Diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2007.

Schindler, H.C.; Montenegro, L.; Montenegro, R.; Carvalho, A.B.; Abath, F.G.C.; Jaureguiberry, G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, p. 355-361, 2001.

Silva, A.J.; Bornay-Llinares, F.J.; Del Aguila de La.Puente, C.D.E.L.A; Moura,H.; Peralta, J.M.; Sobottka,I.; Schwartz,D.A.; Visvesvara, G.S.; Slemend, S.B.; Pieniazek, N.J. Diagnosis of Enterocytozoon bienzei (microsporidia) infections by polymerase chain reaction in stool

samples using primers based on the region coding for small-subunit ribosomal RNA. **Arch Pathol Lab Med.**, v.8, p. 874-879, 1997.

Silva, A.J.; Bornay-Llinares, F.J; Moura, I.N.S; Slemenda, S.B; Tuttle, J.L.; Pieniazek, N.J. Fast and Reliable Extraction of Protozoan Parasite DNA from Fecal Specimens. **Molecular Diagnosis**, v.4, p. 1, 1999.

Simpson, A.J.; Dias Neto, E.; Vidigal, T.H.; Pena, H.B.; Carvalho, O.S.; Pena, S.D. DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.90, p.211-3, 1995.

Singh, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

Soares, L. C. B; Dias. L. C. S.; Kanamura, H. Y.; Oliveira, E. J.; Ciaravolo, R. M. Schistosomiasis mansoni: Follow-up of Control program based on parasitologic and serologic methods in a brazilian community of low endemicity, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 853-859, 2003.

Stacy-Phipps, S.; Mecca, J.J.; Weiss. J.B. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.1054–1059,1995.

Starnbach, M.N.; Falkow, S.; Tompkins, L.S. Species specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **J Clin Microbiol**, v.28, p. 1968–1973,1990.

Steinmann, P.; Keiser, J.; Bos, R.; Tanner, M.; Utzinger, J.; Schistosomiasis and water resources development: systematic review,meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect. Dis.** v.6, p.411–425, 2006.

Sulbaran ,G.S.; Ballen, D.E.; Bermudez, H.; Lorenzo, M.; Noya, O.; Cesari, I.M. Detection of the Sm31 antigen in sera of *Schistosoma mansoni*- infected patients from a low endemic area. **Parasite Immunol**, v. 32(1), p. 20-28, 2010.

Suzuki *et al.* Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. **Parasitology International**,v.55(3), p.213-218, 2006.

Talal, A.H.; Kotler, D.E.; Orenstein, J.M.; Weiss, L.M. Detection of *Enterocytozoon bienersi* in fecal specimens by polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis** , v.26, p.673- 675, 1998.

Tan, S. H.; Tan, B. H.; Goh, C. L. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA using PCR in cutaneous tuberculosis and tuberculids. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 122-127, 1999.

- Tanaka, T.; Kaneda, Y.; Iida, A.; Tanaka, M. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. **Int.J.Parasitol.** v.24, p.179-188, 1994.
- 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.**, v. 1, n. 2, e73, 2007.
- Teles, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2005.
- ten Hove, R.J.; Verweij, J.J.; Vereecken, K.; Polman, K.; Dieye, L.; Van Lieshout, L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.102, p.179-185, 2008.
- Utzinger, J.; Booth, M.; N'Goran, E.K.; Muller, I.; Tanner, M.; Lengeler, C. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. **Parasitology**, v. 122, p.37-544, 2001.
- Van der Werf, M.J.; de Vlas, S.J.; Brooker, S.; Looman, C.W.N.; Nagelkerke, N.J.D. ; Habbema, J.D.F.; Engels, D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop.**, v.86, p.125–139, 2003.
- Vaz, A. J. Diagnóstico imunológico das parasitoses. In: DE CARLI, A. G. **Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo. Editora Atheneu, p.505-539,2001.
- Verjovski-Almeida *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat.Genet.** v.35, p.148-157,2003.
- Veronesi, R. Histórico da Esquistossomose. In: \_\_\_\_\_. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1 ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 1985.
- Verweij, J.J.; Blange, R.A.; Templeton, K.; Schinkel, J.; Brienens, E.A.; van Rooyen, M.A.; van Lieshout, L.; Polderman, A.M. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 3, p.1220—1223,2004.
- Vianey-Liaud, Marc & Dussart, Georges. Starvation, desiccation and use of allosperm in the hermaphrodite, freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata). **J. Mol. Study**, v. 60, n. 3, p. 255-262, 1994.

WHO. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers.** World Health Organization. Geneva, 62 p, 2006.

WHO. **Special Programme for Research and Training in Tropical Disease,** World Health Organization. home page at <http://www.who.int/tdr/>, 2004.

WHO. **The Social Context of Schistosomiasis and its Control: an Introduction and Annotated Bibliography.** World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva, 2008.

Wichmann, D.; Panning, M.; Quack, T.; Kramme, S.; Burchard, G.D.; Grevelding, C.; Drost, C. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. **PLoS Negl Trop Dis**, v.3, 2009.

Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p.3741–3751,1997.

Wooden, J.; Kyes, S.; Sibley, C.H. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Today**, v.9, p. 303–305,1993.

Xu, L.; Harbour, D.; McCrae, M.A. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in feces. **J. Virol. Methods**, v.27, p. 29–38,1995.

Yu, X.P.; Donnelly, C.A.; Anderson, R.M.; Fu, Y.L.; Agnew, A. The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. **Trop Med Parasitol**, v.92, p. 181–185,1998.

Zaki M, Verweij JJ, Clark CG. *Entamoeba histolytica*: direct PCR based typing of strains using faecal DNA. **Exp Parasitol**, v.104, p.77–80, 2003.

Zhou, X.N.; Guo, J.G.; Wu, X.H.; Jiang, Q.W.; Zheng, J.; *et al.* Epidemiology of schistosomiasis in the People's Republic of China,2004. **Emerg Infect Dis**, v.13, p. 1470–1476, 2007.

# APÊNDICE

## APÊNDICE I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Marta Cristhiany Cunha Pinheiro e Teiliane Rodrigues Carneiro, alunas do curso de mestrado em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, estamos realizando uma Pesquisa cujo nome é: “ Avaliação da Sensibilidade de Métodos para Diagnóstico da Esquistossomose Mansônica em Área de Baixa Endemicidade no Estado do Ceará”. Faremos exames de fezes, de sangue e de urina na população da área em estudo. O método de exame de fezes recomendado pelo Ministério da Saúde para diagnóstico da esquistossomose (Kato-Katz) pode vir a não detectar ou detectar poucos ovos nas fezes, devido à baixa carga de vermes nas pessoas residentes nessa área, devido a isso serão realizados os outros métodos de exames nas amostras de fezes para verificar qual será o mais adequado a este tipo de população. O exame de fezes será feito por amostras coletadas em frascos que distribuirei a população e serão examinados no laboratório de Parasitologia da UFC. Após a realização dos exames com as fezes, o material será descartado em sacos plásticos e estes levados para serem destruídos com o lixo do Hospital Universitário Walter Cantídio. O exame de sangue será feito através da coleta de 5 mL do sangue, na Unidade Básica de Saúde que atende esta comunidade. Neste mesmo local será separado o soro e o restante do sangue será descartado com as agulhas e as seringas para ser destruídos com o lixo do Hospital Municipal de Maranguape. Para a realização da coleta de sangue é necessário dar uma pequena picada com uma agulha descartável no braço, usando uma para cada pessoa. Isto causa um pouquinho de dor que passará logo e poderá ou não causar um hematoma no local da picada, a depender de cada indivíduo. O exame de urina será realizado na casa do próprio morador, onde será entregue a este um pote estéril e após a coleta do referido material o mesmo será testado imediatamente e desprezado no lixo do próprio local. Trata-se de um estudo comparativo que proporciona benefício direto para você, pois de acordo com os resultados obtidos terá um maior controle da doença nessa região evitando problemas maiores para a população. Os pacientes que forem diagnosticados nos exames de fezes e na sorologia serão avisados pessoalmente e orientados a receber o tratamento específico para a Esquistossomose pela Secretaria de Saúde do município de Maranguape. Cada paciente receberá a dosagem da medicação adequada de acordo com seu peso e idade.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Firmo um compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Em qualquer etapa de estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela

pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Marta Cristhiany Cunha Pinheiro, que pode ser encontrada na Rua Capitão Francisco Pedro 1210, Rodolfo Teófilo, ou pelo Telefone (085) 9673.7290 e tendo como orientador do projeto o Professor Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra que pode ser encontrado na Rua Capitão Francisco Pedro 1210, Rodolfo Teófilo ou pelo Telefone (085)3366-8265. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará, na Rua Coronel Nunes de Melo 1127, Rodolfo Teófilo que pode ser encontrado pelo Telefone (085)3366-8338.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participar deste estudo.

---

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ...../...../.....

Fui suficientemente esclarecido a respeito do que li ou do que foi lido para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso ao tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

---

Assinatura do sujeito da pesquisa/responsável legal

Data: ..... /...../.....

---

Assinatura da testemunha\*

Data: ...../...../.....

\*Para casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.