



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

MARIANA SILVA SOUSA

UP-CONVERTING PHOSPHOR - LATERAL FLOW CAA, KATO-KATZ E POC-CCA:
UMA ANÁLISE COMPARATIVA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR
***SCHISTOSOMA MANSONI* EM UMA ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE**

FORTALEZA

2015

MARIANA SILVA SOUSA

***UP-CONVERTING PHOSPHOR - LATERAL FLOW CAA, KATO-KATZ E POC-CCA:
UMA ANÁLISE COMPARATIVA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR
SCHISTOSOMA MANSONI EM UMA ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia/Doenças infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S497u Sousa, Mariana Silva

Up-Converting Phosphor-Lateral Flow CAA, Kato-Katz e POC-CCA: uma análise comparativa no diagnóstico da infecção por Schistosoma mansoni em uma área de baixa endemicidade. – 2015.

124f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Patologia/Doenças Infecto-parasitárias.

Orientação: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra.

1. Esquistossomose. 2. Esquistossomose mansoni. 3. Antígeno Anódico Circulante (CAA). 4. *Up-converting phosphor-lateral flow*, POC-CCA. I. Título

CDD: 616.963

MARIANA SILVA SOUSA

***UP-CONVERTING PHOSPHOR - LATERAL FLOW CAA, KATO-KATZ E POC-CCA:
UMA ANÁLISE COMPARATIVA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR
SCHISTOSOMA MANSONI EM UMA ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia/Doenças infecto-parasitárias.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
FIOCRUZ/MG

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, que sempre me deu força em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe Maria de Fátima, aos meus irmãos, Juliana e Acrísio Filho, e a memória do meu pai Acrísio Rocha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar com sabedoria, me dando forças para superar todas as dificuldades e permitindo a realização dos meus projetos, como a conclusão dessa dissertação.

À minha família, que está ao meu lado em todos os momentos. Em especial, ao meu pai Acrísio Rocha que me ensinou a ter determinação e disciplina, a perseverar e se dedicar ao máximo em tudo aquilo que me propunha a fazer, e que por desígnios de Deus, não está mais entre nós no momento do término desta dissertação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra, pela oportunidade de integrar a sua equipe de pesquisa, desde a iniciação científica, pela orientação desta dissertação, pela confiança em mim depositada, pela extrema paciência, pelos ensinamentos e amizade. Sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Govert J. van Dam e sua equipe de pesquisa, da Universidade de Leiden – Holanda, pela parceria concedida, pelo acolhimento em sua universidade, por todo apoio, atenção, investimento e tempo dedicados, e pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira e Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota pelo tempo e pelas valiosas sugestões.

Aos professores Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas e Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira pelas valiosas sugestões para o melhoramento dessa dissertação na banca examinadora de qualificação.

A todos os queridos colegas do Laboratório de Parasitologia e Biologia de Moluscos (LPBM/UFC), que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho. Em especial, ao Joames Kauffmann, pela parceria durante a etapa de inserção na comunidade, ao João Victor Souza, pela disponibilidade de ajuda em todos os momentos em que precisei com o maior compromisso e simpatia e ao José Damião Filho pela ajuda concedida durante a fase final desse trabalho, que foi muito importante.

À Marta Cristhiany Cunha Pinheiro do LPBM/UFC pela imensa ajuda durante este trabalho, pela amizade construída ao longo dos anos, pela paciência e por sempre estar pronta para colaborar, sem medir esforços.

Ao professor Dr. Manoel Martins pela ajuda com as análises estatísticas.

À Célia, técnica de enfermagem do Posto de saúde da localidade e à Silvely, agente comunitária de Bananeiras, que deram o apoio junto à comunidade, ajudando na sua mobilização durante a etapa de coleta das amostras.

Aos habitantes de Bananeiras por seu espírito hospitaleiro e pela motivação de fazer um trabalho que traria benefícios à comunidade.

Aos colegas de turma do curso de mestrado pelo convívio e pelas trocas de experiências.

Aos professores do curso de Pós- graduação em Patologia pelos ensinamentos.

À Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde (BCS)/UFC em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e auxílio na normalização da mesma, em especial, às bibliotecárias Rosane Maria e Norma Linhares.

À Secretaria de Saúde de Capistrano, na pessoa do Dr. Pedro Barbosa – Secretário de Saúde, que concedeu apoio e colaboração à execução desse projeto.

À Secretaria de Saúde do Estado do Ceará pela disponibilização dos medicamentos para a realização do tratamento para esquistossomose.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN-CE) pela disponibilização dos kits de diagnóstico Helm Test®.

À coordenação do mestrado em Patologia, que, através do PROAP, possibilitou auxílio financeiro.

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

A esquistossomose acomete pelo menos 230 milhões de pessoas e está associada com pelo menos 200.000 mortes anualmente no mundo. A detecção dos antígenos circulantes de *Schistosoma* está se tornando uma ferramenta promissora para o diagnóstico de infecções ativas. Os níveis séricos desses antígenos estão relacionados com a carga parasitária e a intensidade de infecção e diminuem rapidamente após o tratamento medicamentoso, demonstrando ser uma abordagem útil também na avaliação da resposta terapêutica. Foi avaliada a prevalência da infecção ativa pelo *S. mansoni* através do ensaio *Up- Converting Phosphor Lateral Flow (UCP-LF)* para determinação do Antígeno Anódico Circulante (CAA) na urina e comparada com a da técnica de Kato-Katz para a detecção de ovos nas fezes e com a do teste *Point-of-Care – CCA (POC-CCA)*, que detecta o Antígeno Catódico Circulante (CCA) na urina. Além disso, a resposta terapêutica foi avaliada pelos métodos que detectam os antígenos circulantes seis semanas após o tratamento. O estudo foi realizado na localidade de Bananeiras, Capistrano, uma área endêmica no Estado do Ceará. De 297 habitantes da localidade, 285 aceitaram participar do estudo, dos quais 159 receberam o tratamento. Destes, 128 entregaram as amostras de urina e fezes requisitadas antes e após o tratamento e foram avaliados pelos três métodos. O ensaio UCP-LF CAA detectou 44 positivos (34,4%). A técnica de Kato-Katz revelou apenas duas amostras de fezes positivas (1,6%) e o POC-CCA detectou 8 positivos (6,2%). As sensibilidades dos diferentes ensaios foram determinadas contra um padrão ("ouro") de positividade de infecção combinado, mostrando-se maior para o ensaio UCP-LF CAA (92%), seguido pelo POC-CCA (17%), enquanto o Kato-Katz (três lâminas) teve uma sensibilidade muito baixa (4%). A maior taxa de prevalência de infecções ativas encontrada foi em pessoas com idades de 30 a 39 anos. As concentrações de CAA antes do tratamento variaram de 0,16 a 61,12 pg CAA / ml de urina, havendo um decréscimo significativo dos níveis de CAA após seis semanas do tratamento (Wilcoxon, $P = 0,003$). Dessa maneira, tendo em conta essas observações promissoras, o UCP-LF CAA mostrou um valor potencial para a determinação da prevalência de esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade; contudo, outros estudos mais amplos são necessários.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, Diagnóstico, Antígeno Anódico Circulante (CAA), *Up-Converting Phosphor – Lateral Flow*, POC-CCA.

ABSTRACT

Schistosomiasis affects at least 230 million people and is associated with at least 200,000 deaths a year worldwide. The detection of *Schistosoma* circulating antigens is becoming a promising tool for the diagnosis of active infection. Serum levels of these antigens are related to the parasite load and the intensity of infection and decrease rapidly after drug treatment, demonstrating also be a useful approach of therapeutic response evaluation. It was evaluated the prevalence of active *S. mansoni* infection by testing Up-Converting Phosphor Lateral Flow (UCP- LF) for determination of Circulating Anodic Antigen (CAA) in urine and it was compared with the Kato-Katz's technique for detection of eggs in the feces and with the Point-of-Care – CCA (POC-CCA) test, which detects the Circulating Cathodic Antigen (CCA) in the urine. Moreover, the therapeutic response was evaluated by the methods that detect circulating antigens six weeks after treatment. The study was conducted in Bananeira's, village - Capistrano town, an endemic area in the Ceara state. From 297 inhabitants of the village, 285 agreed to participate in the study, of whom 159 received treatment. Of these, 128 returned the required urine and feces before and after treatment and were evaluated by three methods. The UCP-LF CAA test detected 44 positive (34.4%). The Kato-Katz technique revealed only two positive feces samples (1.6%) and POC-CCA detected 8 positive (6.2%). The sensitivity of the different assays were determined against a combined infection positive ("gold") standard, being higher for the test CAA UCP-LF (92%), followed by POC-CCA (17%), while the Kato- Katz (three slides) had a very low sensitivity (4%).The highest prevalence rate was found active infections in people aged 30-39 years. CAA concentrations before treatment ranged from 0.16 to 61.12 pg CAA / ml of urine, with a significant decrease in the levels of CAA after six weeks of treatment (Wilcoxon, $p = 0.003$). Thus, given these promising observations, the UCP-LF CAA showed a potential value to determine the prevalence of schistosomiasis in low endemic areas; however, other larger studies are needed.

Keywords: Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Diagnostic, Circulating Anodic Antigen (CAA), Up-Converting Phosphor - Lateral Flow, POC-CCA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	18
Figura 2 –	Distribuição da esquistossomose no mundo, estratificada de acordo com estimativas de prevalência específicas de cada país.....	22
Figura 3 –	Princípio do ensaio <i>Up-Converting Phosphor-Lateral Flow (UCP-LF)</i> para detecção do CAA.....	43
Figura 4 –	Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas fosforescentes $Y_2O_3:S: Yb^{3+}, Er^3+$ de 400 nm aplicadas no método UCP- LF.....	44
Figura 5 –	Princípio de <i>up-conversion</i> ; Processo multi-fóton que converte luz de baixa energia (infravermelho) em luz de alta energia (radiação visível). O íon Er^3+ emite luz verde (550nm).....	44
Figura 6 –	Mapa do Estado do Ceará localizando o Município de Capistrano. À direita, vista ampliada mostrando as áreas limítrofes do município.....	48
Figura 7 –	Localidade de Bananeiras; Vista de satélite, 2013.....	49
Figura 8 –	Fotos da Localidade de Bananeiras; Etapa de assinatura do TCLE e aplicação dos questionários, 2013.....	50
Figura 9 –	Fotos do acondicionamento dos criotubos contendo as amostras de urina para transporte internacional conforme a norma IATA.....	52
Figura 10 –	Preparação do método de Kato – Katz, pelo Kit Helm Test [®]	53
Figura 11 –	Ilustração da tira (strip) específica para CAA utilizada no método UCP-LF.....	54
Figura 12 –	Visão geral do ensaio de fluxo lateral baseado na <i>up-conversion</i> de nanopartículas fosforescentes (<i>Up-Converting Phosphor - Lateral Flow – UCP-LF</i>).....	56
Figura 13 –	Ilustração dos resultados positivo e negativo no método UCP- LF.....	57
Figura 14 –	Kit Bilharzia (<i>Schistosoma</i>) da <i>Rapid Medical Diagnostics</i> [®] (Pretoria, África do Sul).....	58
Figura 15 –	Ilustração esquemática das etapas do estudo.....	59
Quadro 1 –	Características do CAA e CCA ¹	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Distribuição da prevalência, por lâmina analisada e segundo três lâminas, através do método de Kato-Katz – Bananeiras, Capistrano – CE.....	61
Gráfico 2 –	Prevalências da esquistossomose mansoni, detectadas através dos métodos de Kato-Katz, UCP-LF CAA e POC-CCA (n= 128) – Bananeiras, Capistrano - CE.....	64
Gráfico 3 –	Distribuição do grupo de indivíduos ‘verdadeiros positivos’ para <i>S. mansoni</i> , detectados, através dos métodos de Kato-Katz, UCP-LF CAA e POC-CCA, segundo a idade (n= 48) – Bananeiras, Capistrano - CE.....	67
Gráfico 4 –	Gráfico de dispersão dos valores de concentração de CAA antes e após o tratamento (n= 128).....	68
Gráfico 5 –	Decréscimo dos níveis de CAA, mostrando os respectivos valores ‘antes’ e seis semanas ‘após’ o tratamento com praziquantel (n= 128). Dados analisados pelo teste Wilcoxon (P = 0,003).....	69
Gráfico 6 –	Correlação dos níveis de CAA de <i>S. mansoni</i> na urina (pg / ml) determinados pelo UCP-LF CAA com as pontuações de intensidade do POC-CCA antes do tratamento (n= 128). Dados analisados pelo teste Spearman’s rho (P = 0,007).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características da população de estudo quanto ao sexo e à idade (n=128).....	61
Tabela 2 –	Distribuição do número de ovos de <i>S. mansoni</i> , por lâmina analisada, e carga parasitária, expressa em média do número de ovos por grama de fezes (χ) dos indivíduos positivos no Kato-Katz – Bananeiras, Capistrano - CE.....	62
Tabela 3 –	Comparação do UCP-LF CAA antes e seis semanas após o tratamento na detecção da esquistossomose mansoni (n= 128) – Bananeiras, Capistrano-CE.....	63
Tabela 4 –	Comparação entre os métodos UCP-LF CAA e Kato-Katz na detecção da esquistossomose mansoni (n= 128) – Bananeiras, Capistrano - CE.....	65
Tabela 5 –	Comparação entre os métodos UCP-LF CAA e POC-CCA na detecção da esquistossomose mansoni (n= 128) – Bananeiras, Capistrano – CE.....	65
Tabela 6 –	Sensibilidade do método Kato-Katz (3 lâminas) e dos ensaios de CCA e CAA na urina contra um padrão de positividade de infecção por detecção de ovos nas fezes e/ou CAA e/ou CCA em amostras de urina (assumindo 100% de especificidade para todos os testes; n= 48 positivos).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AWA-TCA	<i>Adult Worm Antigen - Trichloroacetic acid</i>
CAA	<i>Circulating Anodic Antigen</i> (Antígeno Anódico Circulante)
CCA	<i>Circulating Anodic Antigen</i> (Antígeno Catódico Circulante)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	<i>Flow Control</i> (Região Controle, Linha Controle)
GASP	<i>Gut-Associated Schistosome Proteoglycan</i>
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodalton
LPBM	Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos
LUMC	<i>Leiden University Medical Center</i>
OPG	Ovos por grama de fezes
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
POC-CCA	<i>Point-of-Care CCA</i>
SCAA500	Ensaio UCP-LF CAA utilizando 500 µL de soro
T	<i>Test</i> (Região Teste, Linha Teste)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Ácido Tricloroacético)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UCAA250	Ensaio UCP-LF CAA utilizando 250 µL de urina
UCAA2000	Ensaio UCP-LF CAA utilizando 2000 µL de urina
UCP-LF	<i>Up-Converting Phosphor- Lateral Flow</i>
UCPs	<i>Up-Converting Phosphors</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Histórico	14
1.2	Agente etiológico – <i>Schistosoma mansoni</i>	15
1.3	Hospedeiros intermediários do <i>S. mansoni</i>	16
1.4	Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	17
1.5	Transmissão	18
1.6	Tratamento	19
1.7	Distribuição e epidemiologia	20
<i>1.7.1</i>	<i>Esquistossomose no mundo</i>	20
<i>1.7.2</i>	<i>Esquistossomose no Brasil</i>	22
<i>1.7.3</i>	<i>Esquistossomose no Ceará</i>	24
1.8	Antígenos circulantes na esquistossomose	25
1.9	Diagnóstico	29
<i>1.9.1</i>	<i>Métodos parasitológicos</i>	30
<i>1.9.2</i>	<i>Métodos moleculares</i>	33
<i>1.9.3</i>	<i>Métodos imunológicos</i>	36
<i>1.9.3.1</i>	<i>Detecção de anticorpos</i>	36
<i>1.9.3.2</i>	<i>Detecção de antígenos</i>	40
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos	47
3	METODOLOGIA	48
3.1	Tipo de estudo	48
3.2	Área e população de estudo	48
<i>3.2.1</i>	<i>Crítérios de inclusão</i>	50
<i>3.2.2</i>	<i>Crítérios de exclusão</i>	51
3.3	Aplicação de TCLE e questionário socioambiental	51
3.4	Coleta e transporte do material biológico	51
<i>3.4.1</i>	<i>Coleta de fezes e de urina</i>	51
<i>3.4.2</i>	<i>Transporte do material biológico para realização do ensaio UCP-LF CAA</i>	52

3.5	Métodos de diagnóstico	53
3.5.1	<i>Método de Kato-katz</i>	53
3.5.2	<i>Ensaio Up – Converting Phosphor - Lateral Flow – UCP-LF</i>	53
3.5.2.1	<i>Produção das tiras (strips) e do conjugado UCP^{MaCAA}</i>	54
3.5.2.2	<i>Pré-tratamento das amostras</i>	55
3.5.2.3	<i>Concentração das amostras</i>	55
3.5.2.4	<i>Ensaio UCP-LF CAA</i>	55
3.5.3	<i>Detecção do Antígeno Catódico Circulante (CCA) – POC-CCA</i>	57
3.6	Tratamento e avaliação pós-tratamento	58
3.7	Análise estatística	59
3.8	Aspectos éticos	60
4	RESULTADOS	61
4.1	Método parasitológico Kato-Katz	61
4.2	Ensaio UCP-LF CAA	62
4.2.1	<i>Antes do tratamento</i>	62
4.2.2	<i>Depois do tratamento</i>	62
4.2.3	<i>Comparação do UCP-L CAA antes e após o tratamento</i>	63
4.3	POC-CCA	63
4.3.1	<i>Antes do tratamento</i>	63
4.3.2	<i>Após o tratamento</i>	63
4.4	Prevalências determinadas segundo os diferentes métodos	64
4.5	Comparação entre os métodos	64
4.5.1	<i>UCP-LF CAA X Kato-Katz</i>	64
4.5.2	<i>UCP-LF CAA X POC-CCA</i>	65
4.6	Sensibilidades determinadas segundo os diferentes métodos	66
4.7	Níveis de CAA antes e após o tratamento	67
4.8	Correlação de UCP-LF CAA e POC-CCA	70
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	80
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE	110
	ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A esquistossomose é uma parasitose conhecida do homem desde a antiguidade. A presença de ovos e de antígenos circulantes de *Schistosoma* spp. em vísceras de múmias do antigo Egito comprovam esse fato (DEELDER *et al.*, 1990; COURA; AMARAL, 2004).

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* (PARAENSE, 2008b).

No Brasil, 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 (PARAENSE, 2008b).

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 deve-se o esclarecimento do ciclo evolutivo do verme no organismo do hospedeiro vertebrado (PESSOA; MARTINS, 1982).

No Brasil, essa doença foi introduzida durante o período colonial, através dos escravos parasitados trazidos da África pelos portugueses para trabalhar nas lavouras de cana-de-açúcar no Nordeste (MAURER, 2005). Após as elucidações feitas por Pirajá da Silva surgiram investigações sobre a distribuição geográfica e dados parasitológicos da doença (ANDRADE, 2002). Todavia, sua importância só foi evidenciada na década de 50 com a realização, por Pellon & Teixeira, do grande inquérito coproscópico nacional de prevalência, inicialmente no nordeste do país e posteriormente em áreas supostamente não endêmicas do sul e sudeste. Desde então, houve um crescimento exponencial nas pesquisas sobre o *Schistosoma mansoni* e a doença por ele provocada (ANDRADE, 2002; COURA; AMARAL, 2004; KATZ; PEIXOTO, 2000).

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 com alternância de duas gerações (sexuada e assexuada), 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).

Os vermes adultos, visíveis macroscopicamente com um corpo cilíndrico branco-acinzentado, vivem nos vasos sanguíneos que ligam o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) do hospedeiro humano, onde podem sobreviver por até 30 anos, com uma média de 3 a 5 anos (GRYSEELS, 2012).

Os vermes apresentam um tegumento complexo e um sistema digestivo cego. Eles se alimentam de células do sangue e globulinas, que digerem num trato intestinal cego e os

restos dos quais são regurgitados na corrente sanguínea humana. Embora a maior parte de sua energia seja obtida pela glicólise (GRYSEELS, 2012), a produção de ovos é dependente da oxidação de ácidos graxos (HUANG *et al.*, 2012).

O macho do *S. mansoni* mede de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1 mm de largura; já a fêmea, é mais fina e mais longa que o macho, medindo de 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura. Como não apresentam órgão copulador, os vermes adultos copulam pela justaposição dos orifícios genitais feminino e masculino, quando a fêmea se aloja no canal ginecóforo (fenda longitudinal, no macho, que alberga a fêmea e onde ocorre a fecundação) (KATZ; ALMEIDA, 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).

1.3 Hospedeiros intermediários do *S. mansoni*

Os hospedeiros intermediários da doença são moluscos do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (Mollusca: Pulmonata, *Planorbidae*), fato que foi descrito inicialmente em 1913 por Miyaki e Suzuki (PARAENSE, 2008a).

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* são encontradas naturalmente infectadas (PEPE *et al.*, 2006) e pelo menos uma das três espécies já foi notificada em 25 das 27 unidades federativas do País (BRASIL, 2007).

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; SILVA, 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).

É comum a ocorrência dos hospedeiros intermediários em áreas intimamente relacionadas às atividades humanas, que por alterações ambientais, formam canais de abastecimento, reservatórios de água para consumo e lazer, bem como valas de irrigação e

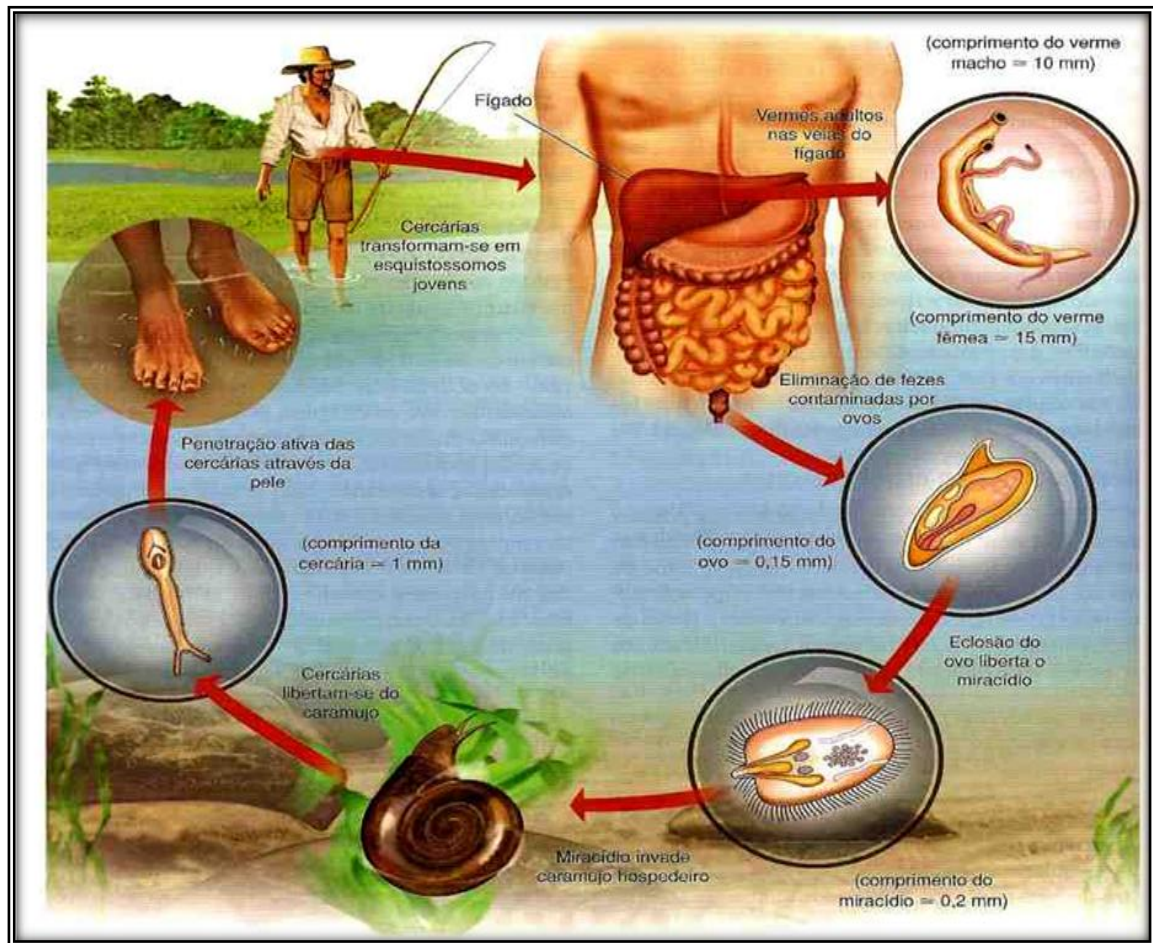
bueiros. Em muitos municípios, principalmente em bairros periféricos, os criadouros de moluscos estão nas valas de hortas destinadas ao cultivo e provenientes de drenagens fluviais (REY, 2000; TELES, 2005; TIBIRIÇÁ, *et al.*, 2006).

1.4 Ciclo evolutivo do *S. mansoni*

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, guiado pela luz e por estímulos químicos, penetra no caramujo. Depois disso, este 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. 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.*, 2012).

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 eritrócíticos (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 (LENZI *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. Juntos, eles migram ao longo do endotélio, contra o fluxo sanguíneo portal, às veias mesentéricas onde começam a produzir os ovos e a realizar a postura, momento em que o ciclo inicia-se novamente (Figura 1) (GRYSEELS *et al.*, 2012).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Melo, 2006.

1.5 Transmissão

As precárias condições socioeconômicas, as dificuldades de acesso aos serviços de saúde, os movimentos migratórios e as más condições de tratamento de água e esgoto constituem os principais fatores para transmissão da esquistossomose em áreas endêmicas. A disseminação dos hospedeiros intermediários, a falta de educação em saúde e a cronicidade da doença têm facilitado a progressão da doença para suas formas mais graves (BARBOSA; GONÇALVES; MELO, 1995; MASSARA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2004).

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).

Vários estudos mostraram que lactentes e crianças em idade pré-escolar são infectados por serem expostos às fontes de água infectadas por suas mães e cuidadores, enquanto as crianças mais velhas (em idade escolar) quando entram em contato com águas contaminadas para nadar, lavar roupa, tomar banho, entre outras atividades (BOSOMPEM *et al.*, 2004; EKPO *et al.*, 2010; GARBA *et al.*, 2010).

No que diz respeito a considerações ecológicas, o desenvolvimento na área de recursos hídricos tem levado à criação de reservatórios, barragens, e à implementação de sistemas de irrigação, fatos que frequentemente levam à expansão do habitat do hospedeiro intermediário e, assim, criam novos locais potenciais para a transmissão da esquistossomose. A partir da realização de uma revisão sistemática e meta-análise evidenciou-se que viver próximo (isto é, ≤ 5 km) a grandes barragens e sistemas de irrigação é um fator de risco para infecção por *S. mansoni*. Por outro lado, a realização de obras que visam à melhoria no abastecimento de água e no saneamento, pode quebrar o ciclo de transmissão através da redução do contato com as massas de água não tratadas e pela diminuição da contaminação ambiental com excrementos (STEINMANN *et al.*, 2006).

1.6 Tratamento

O Praziquantel, uma quinolina-pirazina acilada, é a droga de escolha e a mais amplamente utilizada atualmente para o tratamento da esquistossomose, sendo efetiva contra todas as espécies de *Schistosoma* (GRYSEELS *et al.*, 2012; COLLEY *et al.*, 2014).

O Praziquantel é seguro, barato e eficaz contra vermes adultos, mas tem baixa ou nenhuma atividade contra formas imaturas de *Schistosoma* (GRYSEELS, 2006; GRYSEELS *et al.*, 2012; COLLEY *et al.*, 2014). Ele paralisa e mata os vermes dentro de algumas horas e os efeitos adversos são usualmente poucos e limitados a náuseas transitórias, vômitos, mal-estar e dor abdominal (GRYSEELS, 2006; GRYSEELS *et al.*, 2012). As taxas de cura de até 85-90% têm sido alcançadas, mas a cura completa (100%) tem raramente, ou nunca, sido registrada em áreas endêmicas (DOENHOFF *et al.*, 2009; OLLIARO *et al.*, 2011).

Um regime padrão de 40 mg / kg de peso corporal numa dose única é recomendado para o tratamento de *S. mansoni* em adultos (COLLEY *et al.*, 2014). Depois de uma dose única de 40 mg / kg, de 70-100% dos pacientes deixam de excretar ovos. Na maior parte das pessoas não curadas, a contagem de ovos e as concentrações de antígenos são reduzidas em mais de 95% (STELMA *et al.*, 1995; DAVIS, 1993; UTZINGER *et al.*, 2000). Além disso, ele é julgado seguro para o tratamento de crianças pequenas e mulheres grávidas

(WHO, 2002).

Embora alguns estudos já tenham mostrado a eficácia e a segurança no uso do praziquantel em bebês e crianças em idade pré-escolar (MUTAPI *et al.*, 2011; SOUSA-FIGUEIREDO *et al.*, 2010a; SOUSA-FIGUEIREDO *et al.*, 2010b; NAMWANJE; KABATEREINE; OLSEN, 2011), comprimidos de praziquantel são grandes e têm um sabor amargo, além de que não existe formulação pediátrica prontamente disponível (STOTHARD *et al.*, 2013a). Claramente, existe a necessidade de estudos mais aprofundados não só sobre segurança e dosagem reduzida para bebês e crianças em idade pré-escolar, mas também estudos de farmacocinética para determinar as corretas formulações, dosagens e apresentações para bebês e crianças em idade pré-escolar, o que não sabemos (KEISER; INGRAM; UTZINGER, 2011).

Após o uso extensivo em muitos países endêmicos, existe uma crescente preocupação referente à resistência ao praziquantel. Alguns autores descreveram populações de *S. mansoni* resistentes ao praziquantel (BONESSO-SABADINI; DIAS, 2002; DOENHOFF *et al.*, 2002; MELMAN *et al.*, 2009). Assim, a ameaça de resistência emergente causada pela monoterapia em massa permanece e, portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver drogas alternativas para esquistossomose enquanto o praziquantel ainda é eficaz (CAFFREY, 2007; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; SAYED *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o controle da doença baseou-se basicamente na distribuição em grande escala da quimioterapia específica. Essa 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; MOHAMED; YOUSSEF, 2010).

1.7 Distribuição e epidemiologia

1.7.1 Esquistossomose no mundo

Existem muitas espécies pertencentes ao gênero *Schistosoma*, das quais *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni* são as três espécies principais de *Schistosoma* que infectam humanos. A distribuição das espécies é determinada principalmente pela presença dos hospedeiros intermediários de cada uma delas.

S. haematobium ocorre na África e no Oriente Médio; *S. japonicum* ocorre na China, Indonésia e Filipinas; e *S. mansoni* ocorre na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname. Outras três espécies que também causam a doença em humanos são distribuídas mais localmente: *Schistosoma mekongi*, em vários distritos do Camboja e da República Democrática de Laos; e *Schistosoma guineensis* e *Schistosoma intercalatum*, em áreas de florestas tropicais da África Central. *Schistosoma haematobium* causa a esquistossomose hematúria, vesical ou urinária. *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* e as demais espécies de *Schistosoma* causam a esquistossomose intestinal (WHO, 2014).

A esquistossomose é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres, sem acesso à água potável e saneamento adequado. Estima-se que pelo menos 90% das pessoas com necessidade de tratamento para esquistossomose vivem na África (WHO, 2014). Apesar de aproximadamente 800 milhões de pessoas em risco para esquistossomose e de pelo menos 230 milhões infectados e de 200.000 mortes por ano associadas com a doença, a esquistossomose é uma Doença Tropical Negligenciada – DTN (COLLEY *et al.*, 2014; STEINMANN *et al.*, 2006; THÉTIOT-LAURENT *et al.*, 2013).

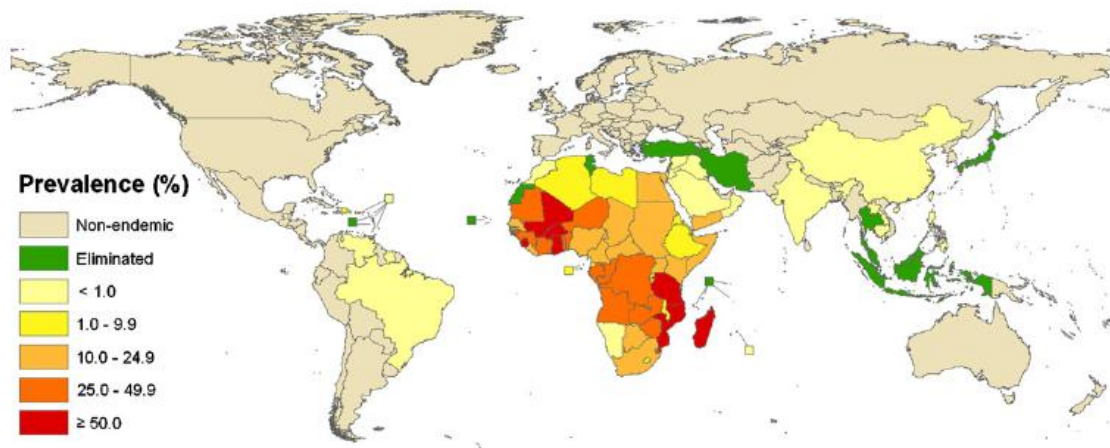
A Figura 2 mostra um mapa global com estimativas das taxas de prevalência da esquistossomose específicas de cada país. Dos 67 países com transmissão ativa, 46 estão na África, representando cerca de 97% de todos os infectados, comportando 85% da população mundial em risco para esta doença. Atualmente, 29 países africanos, o Brasil e o Iêmen abrigam mais de um milhão de casos cada. E em termos globais, 3,4% (1,22 milhões) do total de pessoas em risco para a esquistossomose vive nas Américas, a maioria no Brasil (STEINMANN *et al.*, 2006).

Quase 85% das pessoas infectadas com *Schistosoma* vivem na África subsaariana, a região geográfica mais afetada pela epidemia de HIV (68% de todas as pessoas infectadas com o HIV em todo o mundo e 76% das mortes por SIDA ocorrem nessa região) (UNAIDS, 2007). A esquistossomose urogenital é considerada um fator de risco para a infecção pelo HIV, especialmente em mulheres (WHO, 2012; WHO, 2014) e Downs *et al.* (2012) demonstraram que a infecção por *S. mansoni* também pode ser um fator de risco modificável do HIV, o que coloca milhões de pessoas em todo o mundo em maior risco de aquisição do HIV.

A esquistossomose afeta particularmente comunidades pobres e rurais, em especial, as populações agrícolas e de pesca. Mulheres que fazem tarefas domésticas em águas infectadas, como lavar roupas, também estão em risco. Hábitos de higiene inadequados e

contato com água infectada tornam as crianças especialmente vulneráveis à infecção. As migrações para as áreas urbanas e os movimentos populacionais estão introduzindo a doença para novas áreas. Com o aumento do ecoturismo e viagens, um número crescente de turistas está contraindo esquistossomose (WHO, 2014).

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no mundo, estratificada de acordo com estimativas de prevalência específicas de cada país



Fonte: Utzinger *et al.* (2011, p. S124).

Dependendo dos determinantes locais, a epidemiologia pode variar fortemente de uma localidade para outra. Em regiões endêmicas para esquistossomose, a forma crônica da doença é a predominante, resultante da exposição repetida à cercárias infectantes. Em tais situações, a infecção inicial de uma criança ocorre frequentemente aos 2 anos, com a carga da infecção aumentando de intensidade durante os próximos 10 anos, após o qual intensidade e prevalência de infecção geralmente diminuem na idade adulta. Normalmente, a maior prevalência e intensidades de infecção ocorrem em jovens adolescentes (COLLEY *et al.*, 2014). A frequência de infecções por *Schistosoma* entre bebês e as crianças em idade pré-escolar está sendo cada vez mais reconhecida (STOTHARD *et al.*, 2011b).

1.7.2 Esquistossomose no Brasil

No Brasil, estima-se de 2 a 6 milhões de indivíduos com esquistossomose, contudo esses dados de prevalência da doença no país serão mais concretos e precisos ao término do Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-Helminthoses (INPEG) previsto para 2014. Esse inquérito está sendo atualmente realizado pelo Ministério

da Saúde, através da SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde) com o objetivo de prever, com mais exatidão, a real prevalência da esquistossomose no Brasil e a partir daí poder reavaliar as ações do programa de controle da doença. Dados ainda não publicados desse inquérito indicam que há cerca de 1,5 milhões de indivíduos com esquistossomose no país (informação verbal).¹

Essa doença gera um número significativo de formas graves, com uma média anual de internações igual a 511 (BRASIL, 2014a), e média anual de óbitos igual 500 (BRASIL, 2014b), ambas no período de 2004 a 2013. A doença apresenta uma ampla área de transmissão, que abrange 18 estados e o Distrito Federal (BRASIL, 2014c).

Recentemente, um estudo de mortalidade relacionada à esquistossomose no Brasil entre 2000 e 2011 mostrou que as maiores taxas de mortalidade relacionada à esquistossomose são oriundas da região Nordeste do país; e que apesar da redução da mortalidade nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, a esquistossomose ainda é uma causa de morte negligenciada, com diferenças regionais consideráveis, sendo mencionada como morte subjacente ou associada em mais de 8.000 mortes nesse período (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

A região Nordeste e o estado de Minas Gerais foram as primeiras áreas endêmicas da esquistossomose mansoni no Brasil. A partir daí, a doença se espalhou pelo país. No Sudeste, surgiram focos isolados no Rio de Janeiro, Espírito Santo e em São Paulo. O norte do Paraná, no Sul do país, também se tornou uma área endêmica. Outros três focos da doença foram descritos em mais dois estados sulinos: dois em Santa Catarina e um no Rio Grande do Sul (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Implantado no Brasil entre 1976 e 1993, o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), reduziu significativamente a prevalência da doença e também da incidência de formas graves, porém, houve o surgimento de novos focos. Investigações mais detalhadas são necessárias a fim de verificar se a redução na prevalência da esquistossomose em áreas endêmicas representa realmente uma redução no número de indivíduos infectados; ou, ao invés disso, se reflete uma diminuição na carga parasitária dos indivíduos das áreas tratadas, dificultando sua identificação devido à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos disponíveis atualmente. Resultados de estudos epidemiológicos reforçam a segunda hipótese (ENK *et al.*, 2008).

1:XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, Florianópolis, 2013.

1.7.3 Esquistossomose no Ceará

No Estado do Ceará têm-se as primeiras notificações da esquistossomose a partir dos trabalhos científicos publicados em 1925, no qual se encontrou positividade de 2,8% dos 114 marinheiros cearenses estudados; a seguir em 1934, no qual foi realizado diagnóstico da febre amarela em 7.387 amostras de fígado colhidas no Ceará e se encontrou positividade de 0,66% para *S. mansoni*; e também em 1938, quando se realizou diagnósticos para esquistossomose no município do Crato, sul do Estado, mas apenas em 1940 foi realizado o primeiro inquérito coproscópico no Estado quando se encontrou casos autóctones na cidade de Redenção, com positividade de 12,2% em 199 amostras estudadas (ALMEIDA, 1999).

Pontes *et al.* (1999), em um projeto financiado pelo Ministério da Saúde e pelo Banco Mundial para avaliação das ações de controle da esquistossomose e delimitação das áreas endêmicas, no período de 1977 a 1994, nos Estados do Ceará, Bahia, Pernambuco, Maranhão e Minas Gerais, apontaram quatro focos principais como área endêmica em nosso Estado: I) a Região Hidrográfica Pacoti-Choró-Pirangi, onde as maiores prevalências eram nas localidades banhadas pelo Rio Pacoti e Rio Choró. O Maciço do Baturité era o principal foco por abranger 10 municípios com altos índices de positividade (em relação ao Estado do Ceará); II) a Região Hidrográfica do Rio Curu, área que na época possuía um projeto de irrigação do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS e onde a alta densidade de caramujos transmissores da esquistossomose nos canais de irrigação contribuía para a persistência do foco; III) a cidade de Quixadá e localidades periféricas, que tinham seus focos alimentados pelos canais de irrigação que provinham do Açude Cedro e do Rio Sitiá, afluente do Rio Jaguaribe; IV) a Região Hidrográfica do Rio Jaguaribe, que abrangia os municípios de Barbalha, Crato, Juazeiro do Norte e Missão Velha.

A análise dos coeficientes de prevalência da esquistossomose na área endêmica mostra que os municípios pertencentes à Região Hidrográfica do Pacoti-Choró-Pirangi (Aracoiaba; Aratuba; Baturité; Capistrano; Guaramiranga; Itapiúna; Maranguape; Mulungu; Pacatuba; Pacoti; Palmácia; Redenção), que vinham sendo trabalhados desde 1977-79, apresentaram um comportamento epidemiológico semelhante àquele observado no Estado, em geral, tinham elevados coeficientes de prevalência no levantamento inicial, mostrando uma importante redução nos anos subsequentes.

No início das ações do Programa Especial de Controle da Esquistossomose – PECE no Ceará, segundo semestre de 1976, o município de Capistrano apresentou, no período de 1977-79, 22 localidades positivas e no período de 1988-89, 18 localidades; tendo um

decréscimo de 18% no número de localidades positivas. Posteriormente a 1988-89, houve uma ligeira tendência ascendente, que na maioria dos casos atingiu o pico máximo em 1994 (26.5% para Capistrano, um acréscimo de 53 vezes no período de 1989 à 1994) (PONTES *et al.*, 1999).

Atualmente, dos 184 municípios do Estado, 52 são positivos para *S. mansoni*, segundo os dados da Secretaria de Saúde do Ceará, por meio do PCE (CEARÁ, 2014).

1.8 Antígenos circulantes na esquistossomose

Os parasitos excretam e secretam vários antígenos na circulação do hospedeiro. Esses antígenos podem ser classificados de acordo com o estágio evolutivo do parasito: antígenos cercarianos (ABDEL-HAFEZ; PHILLIPS; ZODDA, 1983; HAYUNGA *et al.*, 1986), antígenos de ovo (principalmente liberados por fluidos advindos do ovo (HASSAN; BADAWI; STRAND, 1992; NOUR EL DIN *et al.*, 1994; RIPERT *et al.*, 1988)) e antígenos de verme adulto, que podem ser antígenos do tegumento do verme (DARVERN *et al.*, 1990; HOUBA *et al.*, 1976) ou antígenos do intestino do parasito (DEELDER *et al.*, 1994), sendo estes últimos os principais antígenos liberados na circulação do hospedeiro pela constante regurgitação dos conteúdos não digeridos do intestino do parasito (VAN LIESHOUT, 1996).

O sistema digestivo dos vermes adultos se inicia com a boca, localizada no fundo da ventosa oral, em seguida vem o esôfago curto bifurcado a altura do acetábulo. A ventosa oral é, portanto, utilizada para a ingestão de alimentos e para a eliminação de materiais residuais do metabolismo e da própria alimentação (HOCKLEY, 1973). O tubo digestivo abriga os principais antígenos circulantes produzidos pelos vermes. O uso de anticorpos monoclonais específicos contra os antígenos circulantes mostrou intensa marcação no ceco ramificado de vermes adultos, por microscopia confocal (BORGES *et al.*, 1994).

Machos e, principalmente, fêmeas adultas, ingerem uma grande quantidade de hemácias. O sangue digerido é hemolisado em seus intestinos: no caso das fêmeas adultas, cerca de 330 mil hemácias por hora, enquanto que nos machos adultos cerca de 30 mil hemácias por hora (LAWRENCE, 1973). No esôfago do verme há hemolisina que libera a hemoglobina para o tubo digestivo, onde é catalisada em peptídeos ou aminoácidos livres, essenciais para o desenvolvimento, o crescimento e a reprodução dos parasitos. Esses peptídeos difundem-se para as células do trato gastro intestinal do parasito ou são incorporados por estas (BOGITSH, 1989). Da digestão da hemoglobina sobra a porção globina que é utilizada, e o produto final da oxidação do grupo heme, caracterizado como

hemozoína, que é regurgitado devido aos movimentos peristálticos do parasito e que acaba acarretando a excreção/secreção de antígenos isolados pertencentes ao próprio sistema digestivo do parasito (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Testes *in vitro* mostraram que comparando a excreção de antígenos circulantes em relação ao sexo do verme, observou-se que fêmeas jovens e adultas produziram mais antígenos que machos (VAN DAM *et al.*, 1996a).

A maioria das pesquisas com enfoque nos antígenos circulantes de *Schistosoma* concentra-se em dois antígenos associados ao intestino do parasito: o Antígeno Anódico Circulante (*Circulating Anodic Antigen* – CAA) e o Antígeno Catódico Circulante (*Circulating Cathodic Antigen* - CCA). Ambos os antígenos são glicoproteínas carregadas eletronicamente sob pH 8,2 que receberam essa nomenclatura devido ao perfil de mobilidade eletroforética apresentado por cada um deles (DEELDER *et al.*, 1976).

A descoberta de antígenos circulantes na esquistossomose se deve a Okabe e Tanaka em 1958, estudiosos que os encontraram em urina de humanos infectados pelo *S. japonicum*.

O CAA foi primeiramente descrito por Berggren e Weller (1967) que o identificaram na urina de hamsters infectados com *S. mansoni*, e posteriormente foi mais caracterizado por Gold; Rosen; Weller (1969); Nash; Prescott; Neva (1974); Nash; Nasir; Jeanloz (1977) e Deelder *et al.*, (1976, 1980) como uma glicoproteína termoestável, de alto peso molecular, fortemente negativa em pH 8,2, solúvel em ácido tricloroacético (TCA) e encontrada nos primórdios celulares do intestino em cercárias e nas células do intestino de vermes adultos.

Em 1994, Bergwerff *et al.* descobriram que as cadeias de carboidratos pertencentes ao CAA possuem uma estrutura completamente única de polissacarídeo, composta por múltiplos dissacarídeos contendo N-acetil-galactosamina (GalNAc) e ácido glucurônico (GlcA), e nenhum equivalente biológico até o momento foi descrito (VAN DAM *et al.*, 2013).

Deelder *et al.*, (1990) e Miller *et al.*, (1992) detectaram o antígeno anódico circulante depositado em tecidos de múmias. Adicionalmente, esse achado demonstrou a grande estabilidade dos antígenos circulantes.

O CCA, ou ‘antígeno M’, foi descrito, independentemente, por Carlier *et al.* (1975) e por Deelder *et al.* (1976), sendo posteriormente mais caracterizado por esses dois grupos (CARLIER; BOUT; CAPRON, 1978; CARLIER *et al.*, 1980a; CARLIER; BOUT; CAPRON, 1980b; DEELDER *et al.*, 1980) como um antígeno também termoestável e solúvel

em ácido tricloroacético (TCA), porém com carga levemente positiva em pH 8,2, sendo este uma glicoproteína de baixo peso molecular cuja população de polissacarídeos contém repetidas unidades de trissacarídeos Lewis X (VAN DAM *et al.*, 1994), que, em contraste com as do CAA, compartilham epítomos com vários componentes do hospedeiro (VAN DAM *et al.*, 1996b).

Deelder *et al.* (1976), Ismail, James e Webbe (1984) e Quian e Deelder (1983) demonstraram que tais antígenos estão presentes na circulação de animais infectados experimentalmente por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*.

Estudos baseados em análises de imunofluorescência realizados com camundongos infectados por cercárias de *S. mansoni* apresentaram os antígenos circulantes em células de kupffer do fígado, em macrófagos nas zonas marginais no baço e em glomérulos renais. (EL-DOSOKY; VAN MARCK; DEELDER, 1984; DEELDER *et al.*, 1985). Além disso, biópsias renais de indivíduos com esquistossomose mansoni ativa demonstraram depósitos de antígenos circulantes (CAA e CCA) em glomérulos, evidenciando-os, especialmente o CAA, como responsáveis pelo mecanismo da glomerulonefrite membranoproliferativa esquistossomótica (SOBH *et al.*, 1987, 1988; BARSOUM, 1993), a qual foi evidenciada principalmente em pacientes com a forma crônica hepatoesplênica (ANDRADE; DE QUEIROZ, 1968; ZATZ; ROMÃO; NORONHA, 2003), mas também, recentemente, foi evidenciado lesão renal glomerular subclínica em pacientes provenientes de área de baixa endemicidade com a forma crônica intestinal da doença, através da dosagem de MCP-1 urinário, mesmo após o tratamento específico (HANEMANN *et al.*, 2013).

Ambos os antígenos são gênero-específicos, e foram detectados no soro e na urina de indivíduos infectados por *S. mansoni* (DEELDER *et al.*, 1989; DE JONGE *et al.*, 1990), *S. haematobium* (KREMSNER *et al.*, 1994), *S. japonicum* (VAN'T WOUT *et al.*, 1992) e *S. intercalatum* (KREMSNER *et al.*, 1993). Recentemente, van Dam *et al.*, (2014b) demonstraram, pela primeira vez, a presença e a detecção de CAA e CCA na urina de indivíduos infectados por *S. mekongi*. Além disso, esses antígenos foram também detectados na circulação de hospedeiros de interesse veterinário, incluindo espécies que infectam o gado (DE BONT *et al.*, 1996; FLOWERS *et al.*, 2002; GABRIEL *et al.*, 2002).

As características mais importantes de cada antígeno circulante estão sumariamente expostas no Quadro 1.

Quadro 1 – Características do CAA e CCA¹

Características	Referências
<u>CAA</u>	
Antígeno Anódico Circulante	01
Também conhecido por GASP	02, 03, 04
Carregado negativamente	05
As cadeias de carboidratos são compostas por múltiplas unidades de dissacarídeos contendo N-acetil-galactosamina e ácido glucurônico	06
<u>CCA</u>	
Antígeno Catódico Circulante	01
Também conhecido por ‘Antígeno M’	07, 08
Neutro ou ligeiramente carregado positivamente	01
As cadeias de carboidratos consistem em múltiplas unidades de trissacarídeos (unidades Lewis X) contendo fucose, galactose e N-acetil-galactosamina	09
Contém alguns epítomos que apresentam reação cruzada com ovos de <i>Schistosoma</i>	10
<u>Ambos os Antígenos são:</u>	
Gênero- específicos	08, 11
Solúveis em TCA	01, 08, 11
Termoestáveis	01, 05, 08
Sensíveis ao periodato	01, 08, 11
Produzidos no epitélio do sistema digestivo de vermes adultos	12, 13, 14, 15
Também presentes nas células primordiais do sistema digestivo de cercárias e vermes jovens	14, 15, 16
Presentes nos seguintes tecidos de hospedeiros:	
Soro e Urina	01, 05, 07, 17
Leite materno (somente CCA)	18
Rins, Fígado e Baço	13, 19, 20, 21
Extremamente estáveis, conforme ilustrado pela detecção de CAA em tecidos de múmias	22, 23

¹ Van Lieshout, 1996.Referências: (01). DEELDER *et al.*, 1976; (02). VON LICHTENBERG; BAWDEN; SHEALEY, 1974; (03). NASH; NASIR; JEANLOZ, 1977; (04). NASH; DEELDER, 1985; (05). BERGGREN; WELLER, 1967; (06). BERGWERFF *et al.*, 1994; (07). CARLIER *et al.*, 1975; (08). CARLIER; BOUT; CAPRON, 1978; (09). VAN DAM *et al.*, 1994; (10). DEELDER *et al.*, 1996; (11). NASH; PRESCOTT; NEVA, 1974; (12). NASH, 1974; (13). DEELDER *et al.*, 1980; (14). DE WATER; FRANSEN; DEELDER, 1986a; (15). DE WATER; FRANSEN; DEELDER, 1986b; (16). ANDRADE; SADIGURSKY, 1978; (17). GOLD; ROSEN; WELLER, 1969; (18). SANTORO *et al.*, 1977; (19). DEELDER *et al.*, 1985; (20). EL DOSOKY; VAN MARCK; DEELDER, 1984; (21). SOBH *et al.*, 1987; (22). DEELDER *et al.*, 1990; (23). MILLER *et al.*, 1992.

A função primária de ambos os antígenos não é exatamente conhecida. Baseado nas suas estruturas altamente glicosiladas, eles provavelmente desempenham um papel na proteção do parasito contra enzimas digestivas, baixo pH ou contra materiais do hospedeiro como anticorpos ou sistema complemento (NASH, 1974; NASH; NASIR; JEANLOZ, 1977), protegendo o verme contra os mecanismos efetores do sistema imune celular do hospedeiro. Nesse sentido, já foi demonstrado que o CAA interage com o primeiro componente do Complemento, C1q (VAN DAM *et al.*, 1993), e que o CCA presumivelmente evoca uma resposta auto-imune devido a similaridade com um antígeno de superfície de granulócitos humanos (VAN DAM *et al.*, 1996b).

A detecção desses antígenos na circulação de potenciais hospedeiros oferece um grande número de aplicações diagnósticas, epidemiológicas e em pesquisa como, por exemplo, a quantificação de carga parasitária e a avaliação da eficácia quimioterápica e do impacto das medidas de controle (VAN LIESHOUT, 1996).

1.9 Diagnóstico

A necessidade de um diagnóstico preciso tem importância crítica para o clínico no fornecimento da conduta correta ao paciente e para os epidemiologistas e gestores de controle da doença para todos os aspectos de prevenção, controle, monitoramento e vigilância. (UTZINGER *et al.*, 2011). No nível de população, por exemplo, mapeamento, estimativa da carga de doença, avaliação da eficácia de drogas esquistossomicidas, farmacovigilância, monitoramento de programas de controle e verificação de locais de eliminação dependem de diagnósticos precisos (PEELING; SMITH; BOSSUYT, 2006; BERGQUIST; JOHANSEN; UTZINGER, 2009; JOHANSEN *et al.*, 2010).

O diagnóstico clínico baseia-se no exame clínico (palpação do abdômen, para verificar o crescimento do fígado e do baço), em informações sobre a história do paciente, do local de moradia, de estadia em áreas de risco e de contato com coleções hídricas possivelmente contaminadas e da sintomatologia apresentada (RABELLO *et al.*, 2008).

Quanto ao diagnóstico laboratorial, os métodos disponíveis podem ser agrupados em duas categorias: métodos de detecção direta - que detectam o parasito, ou componentes deste, como ovos, antígenos, moléculas ou fragmentos destas; e métodos de detecção indireta - que identificam evidências indiretas da presença do parasito e dependem de marcadores clínicos, bioquímicos ou, especialmente, imunológicos associados à infecção. Outra divisão classifica os métodos como qualitativos ou quantitativos. Os métodos qualitativos, na maioria

das vezes, mais fáceis e rápidos de serem feitos, porém não geram projeções sobre a dinâmica de uma infecção, informando somente a existência da infecção. Já métodos quantitativos são usados para calcular a carga parasitária e/ou mostrar a resposta imunológica de um indivíduo ou grupo populacional assim permitindo o estabelecimento de indicadores epidemiológicos em programas de controle (RABELLO *et al.*, 2008).

1.9.1 Métodos parasitológicos

O padrão ouro para o diagnóstico de infecções por *S. mansoni* é a detecção e visualização, por microscopia, de ovos do parasito nas fezes (GRYSEELS, 2012; COLLEY *et al.*, 2014), princípio em que se baseia o método de Kato-Katz, originalmente desenvolvido em meados dos anos 1950 pelos pesquisadores japoneses Kato e Miura (1954), e modificado no início dos anos 1970 por Katz, Chaves e Pellegrino (1972), e que corresponde à técnica mais amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos relativos à esquistossomose intestinal (UTZINGER *et al.*, 2011). Todavia, uma diminuição acentuada da sensibilidade em áreas de baixa endemicidade compromete a estimativa da esquistossomose através da utilização desse método (CAVALCANTI *et al.*, 2013).

O Kato-katz é um método simples, rápido, de custo relativamente baixo, sensível (em áreas de moderada a alta endemicidade), quantitativo, que fornece informações básicas de carga parasitária e, conseqüentemente, intensidade de infecção. Por todas essas razões expostas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) o recomenda como método de diagnóstico para esquistossomose, mas especificamente em áreas de alta endemicidade, uma vez que é amplamente reconhecido na literatura que a examinação de uma única lâmina preparada por esse método subestima a prevalência ‘verdadeira’ de *S. mansoni* em áreas de baixa intensidade de infecção (DE VLAS; GRYSEELS, 1992; YU *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2008b). 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; SINZINKAYO; GRYSEELS, 1996).

Essa técnica utiliza uma quantidade padronizada de 41,7 mg de fezes, e, portanto, a sensibilidade teórica é de 24 ovos por grama (OPG) de fezes (UTZINGER *et al.*, 2011). 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 (RABELLO *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstraram que a sensibilidade dessa técnica pode ser aumentada, que é de suma importância em áreas de baixa transmissão, 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.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012).

Outra estratégia a fim de superar essa limitação, é o exame de uma maior quantidade de fezes. Nesse contexto, foram desenvolvidos outros métodos parasitológicos de fezes, constituindo técnicas mais atuais, tais como: Método Helmintex®, (TEIXEIRA *et al.*, 2007), Método de eclosão (JURBERG *et al.*, 2008) e 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).

Recentemente o Helmintex® foi empregado por Pinheiro *et al.* (2012) em uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará, demonstrando que a proporção de indivíduos infectados identificados através do método Helmintex® (42,5%) foi significativamente maior ($p = 0,003$) do que a proporção de indivíduos infectados identificados com o método de Kato-Katz (9,1%). Em outra área de baixa endemicidade no Estado do Paraná, os resultados obtidos por Caldeira *et al.* (2012) também confirmaram a maior sensibilidade previamente demonstrada do método Helmintex comparado com o método de Kato-katz.

O Método de eclosão consiste em um dispositivo de incubação contendo um recipiente de coleta para detecção de miracídios que eclodem de uma suspensão de fezes quando o paciente é positivo. Apenas o recipiente de coleta é exposto a uma fonte luminosa para que haja uma atração desses miracídios para dentro do mesmo, baseando-se no fototaquitismo positivo do parasito. Embora os métodos de incubação sejam sensíveis, eles apresentam uma limitação uma vez que as amostras de fezes devem estar frescas no momento do exame. Por outro lado, a suspensão de miracídios fixados em formol a 10% poderia ser analisada, pelo menos, 15 dias após a fixação sem perda significativa do número dos mesmos (JURBERG *et al.*, 2008).

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).

Em geral, esses métodos proporcionam uma melhor sensibilidade, mas são mais trabalhosos e demorados (PINHEIRO *et al.*, 2012), o que torna mais complexa a aplicação desses métodos em estudos epidemiológicos de larga escala.

As técnicas parasitológicas de fezes 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, mas também no diagnóstico individual de pacientes com baixa carga parasitária (GARGIONI *et al.*, 2008).

A biópsia retal é 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 (SÃO PAULO, 2009).

Nos métodos diretos, quando a carga parasitária é de intensidade moderada (100-399 OPG) a alta (≥ 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 *et al.*, 2012). Apesar das melhorias nos métodos parasitológicos, estes não conseguem identificar a infecção por *Schistosoma* consistentemente em áreas de baixa endemicidade, e o desenvolvimento de outras ferramentas para o diagnóstico e vigilância se faz necessário (CAVALCANTI *et al.*, 2013).

Em uma fase inicial de um programa de controle, quando o objetivo é o controle da morbidade, a prevalência e a intensidade da infecção são normalmente altas, e, portanto, métodos diretos mostram acurácia diagnóstica suficiente. Contudo, a prevalência e particularmente a intensidade da infecção são reduzidos por meio do tratamento, e, por conseguinte, os métodos diretos tornam-se menos sensíveis. (UTZINGER *et al.*, 2011). Nesse contexto, esses métodos necessitam ser complementados ou substituídos por técnicas imunológicas com base na detecção de antígeno ou anticorpo (VAN LIESHOUT *et al.*, 2000; DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004; BERGQUIST; JOHANSEN; UTZINGER, 2009; JOHANSEN *et al.*, 2010), ou ferramentas moleculares, como abordagens baseadas na

reação em cadeia da polimerase (PONTES *et al.*, 2003; TEN HOVE *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2010).

1.9.2 Métodos moleculares

A técnica molecular baseada na PCR, amplamente relatada para o diagnóstico de vários patógenos infectantes, vem sendo considerada potencialmente valiosa como uma ferramenta complementar no diagnóstico da esquistossomose (UTZINGER *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2013). Os ensaios à base de DNA têm provado também ser uma ferramenta potencial para avaliação de cura pós - quimioterapia e podem mudar o cenário para as ações de controle da infecção por *Schistosoma* (GENTILE *et al.*, 2011; IBIRONKE *et al.*, 2012).

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.*, 1988). 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).

No estudo de *Schistosoma* sp., inicialmente a técnica de PCR foi 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).

Algumas 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; HAMBURGER *et al.*, 1998; VIDIGAL *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2006; KANE *et al.*, 2013) e na identificação de águas contaminadas com cercárias (HAMBURGER *et al.*, 1998; HUNG *et al.*, 2008).

No estudo realizado por Pontes; Dias-Neto; Rabelo (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.

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.* (2006b), 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*).

Recentemente, a abordagem de alta tecnologia de sistemas de PCR em tempo real tem sido aplicada à parasitologia e demonstrado como eles são poderosos instrumentos alternativos para a quantificação da carga parasitária (GOMES *et al.*, 2014). Gomes *et al.* (2006) descreveram, pela primeira vez, a utilização dessa tecnologia para o diagnóstico da esquistossomose. O método descrito empregou o sistema de detecção inespecífica do corante SYBER Green, visando um pequeno fragmento de 96bp do gene que codifica a pequena subunidade ribossômica do RNA (SSU rRNA) de *S. mansoni*. Posteriormente, em Gana, foi empregado um sistema de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção específica de sondas fluorescentes TaqMan®, visando o internal - transcribed - spacer 2 (ITS-2), para a detecção de *S. haematobium* em amostras de urina (OBENG *et al.*, 2008). O formato multiplex de PCR em tempo real foi testado em amostras de fezes por ten Hove *et al.* (2008) com os iniciadores e sondas específicos para *S. haematobium* e *S. mansoni* voltados para genes da citocromo oxidase 1 (COX 1) dos parasitos.

Vários outros grupos desenvolveram ensaios adicionais altamente sensíveis e específicos baseados em PCR convencional (SANDOVAL *et al.*, 2006a; OLIVEIRA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; ENK *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2013; LODH *et al.*, 2014), e também em PCR em tempo real (GENTILE *et al.*, 2011; CNOPS *et al.*, 2012; WICHMANN *et al.*, 2013; ESPÍRITO- SANTO *et al.*, 2014a; SCHWARZ *et al.*, 2014) para o diagnóstico da esquistossomose. Todos se mostraram eficientes na identificação dos casos positivos, mesmo em pacientes de baixa carga parasitária, e no correto diagnóstico dos casos

negativos, demonstrando melhorar o diagnóstico da infecção por *Schistosoma* como resultado das elevadas sensibilidade e especificidade desses testes em comparação com os métodos convencionais, tanto em estudos experimentais quanto em humanos.

Métodos baseados em PCR são considerados altamente sensíveis porque eles detectam aproximadamente 2,4 ovos / grama, o que representa um limite de detecção de 0,01 a 10 fg de material genômico, dependendo das espécies de *Schistosoma* estudadas (CNOPS *et al.*, 2012; CAVALCANTI *et al.*, 2013).

Além disso, os métodos quantitativos, tais como a PCR em tempo real permite a avaliação da carga parasitária, e a infecção pode ser detectada tão cedo como de 1-30 dias pós-infecção em estudos experimentais. Esse é um método promissor para o diagnóstico da infecção aguda em populações recentemente expostas, como viajantes (GOMES *et al.*, 2010; KATO-HAYASHI *et al.*, 2010; GENTILE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011b).

Para a detecção específica de DNA, os ensaios de PCR utilizam diferentes genes-alvo de *Schistosoma* (CNOPS *et al.*, 2012); como exemplos de genes – alvo mais comumente empregados na literatura tem-se o gene da pequena subunidade do DNA ribossomal - 28S rDNA (SANDOVAL *et al.*, 2006b; CNOPS *et al.*, 2012), uma seqüência de 121 pb altamente repetitiva ao longo do genoma de *S. mansoni* (WICHMANN *et al.*, 2009; CLERINX *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2013; LODH *et al.*, 2014), o gene da subunidade 1 da enzima citocromo oxidase 1 – COX 1 (TEN HOVE *et al.*, 2008; GENTILE *et al.*, 2011) e seqüências do internal-transcribed-spacer 2 – ITS 2 (OBENG *et al.*, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2014).

Além disso, diferentes amostras clínicas são agora apropriadas para o diagnóstico, incluindo fezes (TEN HOVE *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2010; SCHWARZ *et al.*, 2014), soro (CLERINX *et al.*, 2011; WICHMANN *et al.*, 2013), plasma (WICHMANN *et al.*, 2009), urina (OBENG *et al.*, 2008; CNOPS *et al.*, 2012; LODH *et al.*, 2014) e secreção vaginal (KJETLAND *et al.*, 2009).

Concomitantemente, a maioria das limitações anteriores no uso de PCR para detectar as infecções parasitárias, incluindo dificuldades de isolamento do DNA do parasito e presença de substâncias inibidoras, foram melhoradas e simplificadas, e a superação dos problemas de contaminação já foi relatada na literatura (SUBRUNGRUANG *et al.*, 2004).

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; Atualmente, existe uma diversidade de kits comerciais disponíveis para extração e purificação de DNA, de forma a serem empregados nos mais diferentes tipos de fontes de DNA potenciais, ampliando o campo de utilização da PCR.

Assim, métodos baseados em PCR parecem uma alternativa para o diagnóstico da esquistossomose com alta sensibilidade e especificidade e um papel importante para a adequada tomada de decisões em áreas com configurações de erradicação da doença (CAVALCANTI *et al.*, 2013). No entanto, a PCR continua a ser um método caro, embora a redução de custos possa ser obtida por modificações metodológicas, tais como o melhoramento dos métodos de extração de DNA (ENK *et al.*, 2012). Recentemente, a detecção de DNA por novas tecnologias, como a técnica de *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), desenvolvida por Notomi *et al.* (2000), mostrou-se como uma melhor alternativa sob o aspecto custo-benefício (WANG *et al.*, 2011; NJIRU *et al.*, 2012).

1.9.3 Métodos imunológicos

O imunodiagnóstico da esquistossomose há algum tempo tem sido proposto na literatura para superar algumas das limitações dos métodos parasitológicos, que são a variação dia-a-dia e intra-espécime da excreção dos ovos de *Schistosoma*, o risco de falha na detecção de infecções de baixa intensidade e a relativa demora das metodologias parasitológicas (HAMILTON *et al.*, 1998; VAN LIESHOUT *et al.*, 2000; DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004). As abordagens imunológicas se baseiam na detecção de anticorpos ou de antígenos.

1.9.3.1 Detecção de anticorpos

Vários métodos imunológicos foram propostos para o diagnóstico da esquistossomose através da detecção de anticorpos; dentre os formatos que foram validados em ensaios de campo de grande escala estão o teste de hemaglutinação indireta, o teste de imunofluorescência indireta, o *circumoval precipitin test* (COPT) e o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). O método imunoenzimático ELISA constitui a técnica mais comumente e amplamente utilizada atualmente para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, oferecendo a possibilidade de detectar diferentes classes de anticorpos, bem como a utilização de uma vasta gama de antígenos (GOMES *et al.*, 2014).

Contudo, nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários testes rápidos para detecção de anticorpos anti - *Schistosoma*; Esse formato de teste de diagnóstico para o uso no ponto-de-cuidado (*Point-of-Care -POC*) mostra-se bastante promissor e tende a se tornar cada vez mais útil nos programas de controle de larga escala para a esquistossomose (XU *et al.*,

2011; COULIBALY *et al.*, 2013a; DAWSON *et al.*, 2013; NAUSCH *et al.*, 2014). Ensaio de POC podem envolver analisadores portáteis, mas cada vez mais eles são auto-suficientes, fáceis de usar, podendo ser realizados sobre uma mesa na sala de emergência, na cabeceira do paciente, em uma pequena clínica, enfermaria, ou departamento de hospital. Tais sistemas de ensaio combinam tipicamente o diagnóstico rápido (menos de uma hora) com uma menor manipulação de amostra e dos resultados do teste, reduzindo assim o tempo, custo e eventuais erros (OUELLETTE *et al.*, 2009).

A maioria dos ensaios de detecção de anticorpos mede a reatividade imunológica no soro ao antígeno solúvel de verme adulto, que é a fonte mais fácil e abundante de material antigênico (DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004), e ao antígeno solúvel do ovo do parasito para fins de diagnóstico, utilizando principalmente extratos brutos, mas também outras frações do parasito, como proteínas do tegumento do *Schistosoma*. (CAVALCANTI *et al.*, 2013). Antígenos das formas imaturas, cercárias (CHAND *et al.*, 2010; KINKEL *et al.*, 2012) e esquistossômulos também têm sido empregados (CARVALHO *et al.*, 2011; GRENFELL *et al.*, 2013b, 2013c).

Considerando que vários antígenos estão disponíveis para fins de diagnóstico, estudos de soro-reatividade demonstram resultados variáveis, mesmo quando são usados proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (CAVALCANTI *et al.*, 2013).

Por serem de fácil preparo e terem resposta positiva no emprego em imunodiagnóstico, os extratos brutos apresentam vantagens. Porém, a utilização de preparações purificadas é muito visada devido à ausência de reações cruzadas que ocorrem através de porções antigênicas de *S. mansoni* compartilhadas por diversos parasitos, protozoários e até bactérias (BOUKLI *et al.*, 2011). Por esta razão, as pesquisas se tornam cada vez mais refinadas na utilização de antígenos purificados que induzam a formação de ligações antígeno-anticorpo mais específicas. São exemplos desses o *Major Serological Antigen* (MSA) (STEK *et al.*, 1983), o antígeno CEF6 que envolve frações antigênicas de ovos (DOENHOFF *et al.*, 2003; TURNER *et al.*, 2004), os antígenos *Adult Microsomal Antigen* (MAMA) (HANCOCK; TSANG, 1986; TORRES *et al.*, 2001), CCA (GRENFELL *et al.*, 2013a), Sm31/32 (NOYA *et al.*, 2001, 2003; SULBARAN *et al.*, 2010), RP26 (MAKAROVA *et al.*, 2003, 2005), e um antígeno larval de 37 kDa que demonstrou ser um bom marcador de susceptibilidade (WU, 2002).

Infecções ativas de *S. mansoni* podem ocorrer na presença de baixa carga parasitária com ovos difíceis de serem detectados através da coproscopia. Devido à sua alta sensibilidade e facilidade de uso, ensaios baseados na detecção de anticorpos se tornaram

amplamente utilizados nos Programas Nacionais de vários países onde a prevalência foi reduzida (CAVALCANTI *et al.*, 2013).

Em áreas de baixa endemicidade e / ou após a quimioterapia generalizada, os estudos têm demonstrado que os imunoenaios são superiores ao diagnóstico parasitológico (GONÇALVES *et al.*, 2006; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014b).

Na República Popular da China, uma abordagem comum para o diagnóstico de *S. japonicum* é primeiramente a triagem de populações de risco para anticorpos, seguido por microscopia de fezes dos indivíduos anticorpos-positivo (UTZINGER *et al.*, 2005; ZHU, 2005; BALEN *et al.*, 2007). No Brasil, essa abordagem foi proposta para o diagnóstico de *S. mansoni* em uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará (DA FROTA *et al.*, 2011).

A combinação de microscopia de fezes com métodos sorológicos foi proposta para detecção de casos de esquistossomose mansoni em áreas de baixa transmissão (GONÇALVES *et al.*, 2006; NOYA *et al.*, 2006; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007; IGREJA *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2012; GRENFELL *et al.*, 2013d).

Em populações não tratadas vivendo em áreas de baixa endemicidade, resultados de reatividade IgG-positiva / coproscopia-negativa (IgG + / copro-) podem representar uma infecção ativa, pois, após testes repetitivos, alguns indivíduos revelam-se excretadores de ovos e devem, portanto, ser tratados (IGREJA *et al.*, 2007). Além disso, cerca de 8% desse grupo é composto de indivíduos com menos de 11 anos que pode ter sido recentemente infectado (IGREJA *et al.*, 2007; MCMANUS *et al.*, 2011; VERANI *et al.*, 2011).

Apesar de baixa carga parasitária, a apresentação clínica pode ser grave e/ ou atípica, como neuroesquistossomose e infecções genitais. Uma vez que a maioria desses indivíduos não excreta ovos do parasito, a detecção de anticorpos no fluido cerebrospinal e no soro é necessária para um diagnóstico correto (FERRARI *et al.*, 2010; FREITAS; OLIVEIRA; SILVA, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2011).

A detecção de anticorpos também é importante para o diagnóstico de viajantes sem excreção de ovos do parasito (CLERINX *et al.*, 2011). Como esses indivíduos podem ser assintomáticos, ou mesmo desenvolver infecção aguda ou crônica, o diagnóstico da esquistossomose importada depende, em última instância, da sorologia positiva (MELTZER *et al.*, 2006; NICOLLS *et al.*, 2008). Além disso, a detecção de anticorpos é crucial na era do desenvolvimento da vacina para helmintos para determinar eficácia e proteção induzida pela imunização (HOTEZ *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2011).

Contudo, apesar da alta sensibilidade dos ensaios baseados na detecção de anticorpos, a especificidade é geralmente baixa (LIN *et al.*, 2008a; ZHOU; ZHENG; JIANG, 2011a). Além disso, os níveis de anticorpos permanecem elevados por longos períodos de tempo após a quimioterapia bem sucedida, o que representa um dilema diagnóstico: falha para diferenciar infecções ativas e curadas (ROLLINSON *et al.*, 2013; UTZINGER *et al.*, 2011). No entanto, a negatividade ou o declínio dos títulos de anticorpos pode ocorrer após uma resposta eficiente à terapia e / ou uma exposição interrompida em populações com longo prazo de acompanhamento (CHUNGE *et al.*, 2011). Finalmente, pode haver um alto grau de reatividade cruzada em ambientes onde *S. mansoni* e outras infecções por trematódeos coexistem (BERGQUIST; JOHANSEN; UTZINGER, 2009; JOHANSEN *et al.*, 2010).

Testes rápidos para detecção de anticorpos em novos formatos de ensaio foram relatados para *S. japonicum* (CHU *et al.*, 2005; WEN *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2005). Também tem sido testado um ensaio de Western blot para detecção de anticorpos anti - *S. mansoni* (SULAHIAN *et al.*, 2005) e um ensaio de immunoblot de antígenos de membrana de *S. mansoni*, *S. intercalatum* e *S. haematobium* contra soros de pacientes infectados por *Schistosoma* (CESARI *et al.*, 2010). Esses novos formatos usam antígenos brutos e ainda precisam ser validados em ensaios de campo em grande escala.

Na China, outro teste rápido para a detecção de anticorpos contra *S. japonicum* tem sido amplamente avaliada em área de baixa endemicidade com bons resultados (XU *et al.*, 2011).

Na África, um teste rápido para detecção de anticorpos anti - *Schistosoma* está atualmente sendo avaliado no campo (COULIBALY *et al.*, 2013a; DAWSON *et al.*, 2013; NAUSCH *et al.*, 2014), e apesar da necessidade de outras avaliações usando testes mais precisos como padrão de referência, esses resultados indicam que este poderia ser uma ferramenta útil para o rápido mapeamento da prevalência de *S. mansoni* e *S. haematobium* em áreas endêmicas. Ele é acessível, fácil de usar e permite o diagnóstico de ambas as espécies.

Recentemente, um ensaio de fluxo lateral com um sistema de detecção que utiliza a tecnologia de nanopartículas fosforescentes ultrasensíveis, inicialmente desenvolvido para detecção do antígeno anódico circulante, foi aplicado para a detecção de anticorpos anti - *Schistosoma* no soro demonstrando resultados promissores, e também será analisado para aplicações usando amostras não invasivas, tais como urina e saliva (CORSTJENS, *et al.*, 2014a). A presença de anticorpos na urina foi recentemente demonstrada para *S. mansoni* e *S. haematobium* (ELHAG *et al.*, 2011), e estudos anteriores mencionaram detecção de

anticorpos anti- *S. mansoni* (SANTOS *et al.*, 2000) e anticorpos anti- *S. japonicum* (WANG *et al.*, 2002) na saliva.

1.9.3.2 Detecção de antígenos

Os ensaios imunológicos mais promissores, no entanto, e que têm sido descritos extensivamente são os ensaios para detecção de antígenos circulantes do parasito no soro, na urina, e potencialmente na saliva do hospedeiro. Dois antígenos circulantes bem descritos para *Schistosoma*, ambos aplicados para diagnosticar a infecção ativa, são o CCA e o CAA (VAN LIESHOUT; POLDERMAN; DEELDER, 2000; VAN DAM *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2006; UTZINGER *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2013; COLLEY *et al.*, 2013; VAN DAM *et al.*, 2013; CORSTJENS *et al.*, 2014a; GOMES *et al.*, 2014).

Alternativamente à detecção dos ovos do parasito, a detecção dos antígenos circulantes de *Schistosoma* está se tornando uma importante ferramenta para o diagnóstico de infecções ativas, uma vez que somente vermes vivos eliminam antígenos para a circulação (CORSTJENS *et al.*, 2014a). Além disso, os níveis séricos desses antígenos estão relacionados com a carga parasitária e intensidade de infecção (POLMAN *et al.*, 1995; VAN LIESHOUT *et al.*, 1995a, 1995b; VAN LIESHOUT; POLDERMAN; DEELDER, 2000; CORSTJENS *et al.*, 2014a) e diminuem rapidamente após o tratamento medicamentoso, demonstrando ser uma abordagem útil também na avaliação da eficiência da administração do medicamento e, conseqüentemente, na avaliação de cura (EL- MORSHEDY *et al.*, 1996; CORSTJENS *et al.*, 2014a). Portanto, a detecção de antígenos demonstra várias vantagens sobre a detecção de anticorpos.

O desenvolvimento de metodologias de ELISA baseadas no emprego de anticorpos monoclonais específicos para porções glicídicas do CAA (DEELDER *et al.*, 1989) e do CCA (DE JONGE *et al.*, 1990) tornou possível a detecção desses antígenos de uma forma sensível e altamente específica.

A detecção e a quantificação desses antígenos através de ELISA demonstrou uma correlação significativa entre os níveis de CAA e CCA e a carga parasitária (VAN LIESHOUT *et al.*, 1992), bem como sua utilidade para o monitoramento após o tratamento (KREMSNER *et al.*, 1994). Além disso, eles foram aplicados, por exemplo, para a análise de variações de carga parasitária (VAN LIESHOUT *et al.*, 1995b), para determinar diferentes esquemas de tratamento (VAN LIESHOUT *et al.*, 1994) ou para estudar relações com diferentes aparências clínicas da doença (DE JONGE *et al.*, 1991).

Ensaio de diagnóstico direcionados para a detecção do CAA requerem a extração da amostra com ácido tricloroacético (TCA) seguida de centrifugação, que deixa o material proteico precipitado num *pellet* e os componentes de carboidratos no sobrenadante, onde poderá ser detectada a presença desse antígeno. A vantagem dessa extração é uma melhoria da sensibilidade analítica, por permitir uma maior concentração da amostra, que o torna adequado para aplicações em regiões de baixa endemicidade para detectar infecções ativas por uma baixa carga de vermes (AGNEW *et al.*, 1995; VAN LIESHOUT *et al.*, 1995b; VAN DAM *et al.*, 1996c; LEUTSCHER *et al.*, 2008).

O CAA-ELISA determina os níveis de CAA no soro para todas as espécies de *Schistosoma* humanos com praticamente 100% de especificidade (DEELDER *et al.*, 1989) e foi aplicado em vários estudos epidemiológicos e laboratoriais (AGNEW *et al.*, 1995; DEELDER *et al.*, 1989; LEUTSCHER *et al.*, 2008; VAN DAM *et al.*, 1996a.; VAN LIESHOUT *et al.*, 1995b); seu valor foi demonstrado em estudos (soro) epidemiológicos em populações com infecções de moderada a alta intensidade (POLMAN *et al.*, 2002). Contudo, o CAA-ELISA perde sensibilidade ao diagnosticar infecções leves, como, por exemplo, no diagnóstico de casos de esquistossomose importados no grupo de viajantes internacionais (VAN LIESHOUT *et al.*, 1997).

A implementação do ELISA no diagnóstico clínico de rotina é complexa, uma vez que o ELISA pode perder robustez quando realizado apenas ocasionalmente, além de não ter sido desenvolvido para identificação de um único caso. Quando o teste é implementado na rotina diária, com vários controles e amostras testadas em duplicata, o ELISA pode detectar CAA no soro em níveis tão baixos como 40 pg / mL. Todavia, quando o ensaio é efetuado de forma menos regular e as amostras são testadas apenas uma vez essa sensibilidade pode nem sempre ser alcançada (CORSTJENS *et al.*, 2008b; LEUTSCHER *et al.*, 2008).

Além disso, os procedimentos de ELISA permanecem relativamente lentos, mesmo num formato otimizado e padronizado e exigem pessoal qualificado e laboratórios bem equipados (VAN DAM *et al.*, 2004), o que faz com que não possa ser rotineiramente utilizado para o diagnóstico da comunidade no campo e que sua aplicabilidade seja menos visível em locais onde há restrições financeiras e onde as configurações de laboratório não estão bem desenvolvidas (LEGESSE; ERKO, 2007).

Dessa forma, num esforço para melhorar as técnicas para o diagnóstico de esquistossomose em nível de campo van Dam *et al.* (2004) desenvolveram um ensaio de fluxo lateral para a detecção de CCA na urina. O formato laboratorial desse teste foi desenvolvido em um teste rápido Point-of-Care atualmente disponível no mercado (POC-CCA; *Rapid*

Medical Diagnostics; Pretoria, África do Sul). Esse teste ainda não é recomendado pela OMS, mas vários estudos foram conduzidos até o momento para determinar a eficácia e a aplicabilidade desse dispositivo no campo para o diagnóstico da esquistossomose. No geral, esse teste vem sendo normalmente bem aceito e demonstrando ser suficientemente sensível e específico para ser tomado como uma alternativa para a microscopia de ovos em estudos de mapeamento e pesquisas de campo (LEGESSE; ERKO, 2007; MIDZI *et al.*, 2009; SHANE *et al.*, 2011; STANDLEY *et al.*, 2010; COULIBALY *et al.*, 2011; DEELDER *et al.*, 2012; COULIBALY *et al.*, 2013b; ERKO *et al.*, 2013; ADRIKO *et al.*, 2014; LAMBERTON *et al.*, 2014).

Recentemente, um apanhado de avaliações do teste POC-CCA em cinco países, financiado pelo *Schistosomiasis Consortium for Operational Research and Evaluation* (SCORE), demonstrou que o método é importante para a detecção de *S. mansoni* em áreas endêmicas, sendo suficientemente sensível e específico para ser recomendado como uma ferramenta de mapeamento para determinar os níveis de prevalência de *S. mansoni* em crianças em idade escolar (COLLEY *et al.*, 2013).

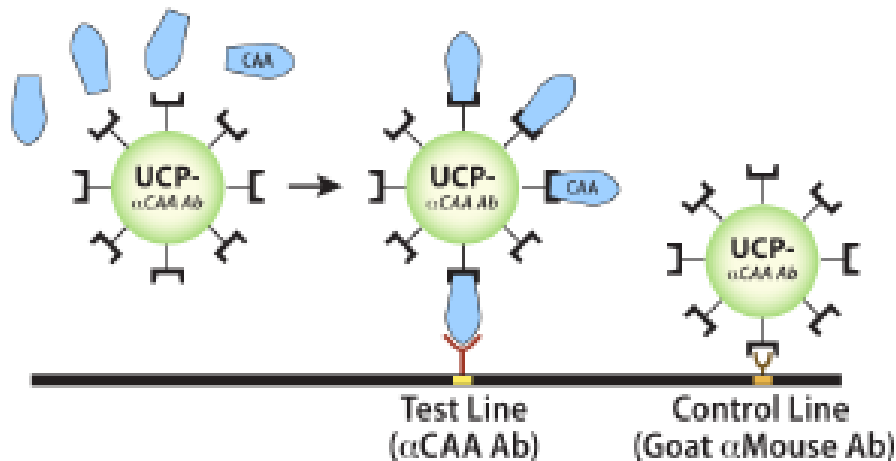
Infelizmente, a precisão do teste POC-CCA em infecções por *Schistosoma haematobium* é variável e deve ser mais bem avaliada (MIDZI *et al.*, 2009; AYELE *et al.*, 2008; OBENG *et al.*, 2008; STOTHARD *et al.*, 2009). Estudos utilizando o CCA-ELISA (DEELDER *et al.*, 1994; AGNEW *et al.*, 1995) indicam que o POC-CCA é aplicável para *S. japonicum*.

A fim de prosseguir o desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico da esquistossomose que possam ser empregados em futuras aplicações Point-of-Care e também para melhorar ainda mais a robustez foi introduzido um ensaio de fluxo lateral em combinação com uma tecnologia de nanopartículas fosforescentes ultra-sensíveis (*Up-Converting Phosphor-Lateral Flow – UCP-LF*) para detecção do CAA no soro. O UCP-LF CAA, assim como o CAA-ELISA, requer a extração da amostra com TCA e depende da utilização de um par de anticorpos específicos para capturar o alvo desejado; o mesmo anticorpo monoclonal é utilizado para ligar o antígeno tanto na nanopartícula fosforescente, bem como na área de captura específica da linha (T) do teste na tira de nitrocelulose formando um imunossanduíche (Figura 3) (CORSTJENS *et al.*, 2008b).

Esse ensaio demonstrou uma sensibilidade analítica inferior a 1 pg / ml, cerca de 10 vezes menor do que a do CAA-ELISA (CORSTJENS *et al.*, 2008b, 2014a). É esperado que a concentração de 1 pg / ml no soro permita a identificação de infecções por um único

verme, uma vez que estudos de cultura de vermes *in vitro* e estudos com babuínos infectados experimentalmente indicam níveis de CAA de aproximadamente 5 pg / mL no soro num estado estacionário (VAN DAM *et al.*, 1996a; WILSON *et al.*, 2006).

Figura 3 – Princípio do ensaio *Up-Converting Phosphor-Lateral Flow (UCP-LF)* para detecção do CAA



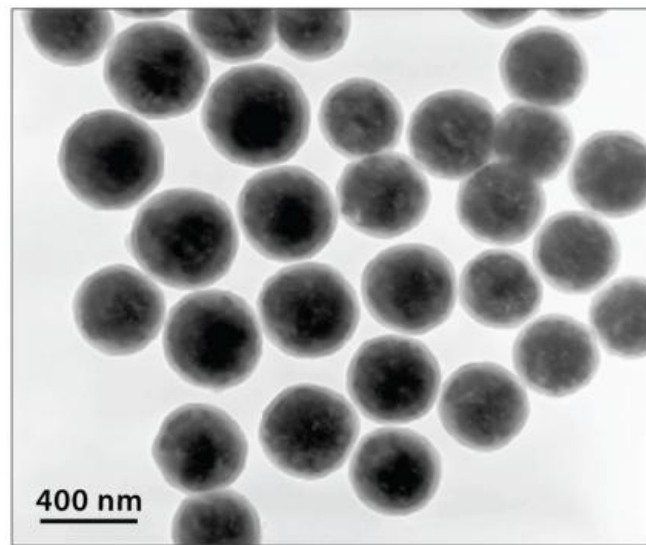
Fonte: Corstjens *et al.*, 2013.

A introdução da tecnologia das nanopartículas fosforescentes ultra-sensíveis (UCPs) foi um fator importante para o aumento da sensibilidade (CORSTJENS *et al.*, 2005). As partículas fosforescentes $Y_2O_3S: Yb^{3+}, Er^3+$ de 400 nm aplicadas nesse ensaio (Figura 4) são excitadas com luz infravermelha (IR, 980 nm) e emitem luz verde de maior energia (550 nm) em um processo chamado de *up-conversion* (Figura 5). Essas partículas consistem de uma “rede hospedeira” de materiais inorgânicos, na qual estão incrustados os íons de elementos raros (absorvedor e emissor), tipicamente lantanídeos trivalentes, que são os responsáveis pelo processo de *up-conversion* em si. Este está completamente restringido à estrutura das partículas e, portanto, livre de auto-fluorescência a partir de outros componentes do ensaio (ZARLING *et al.*, 1997; ZIJLMANS *et al.*, 1999; GORYACHEVA; LENAIN; DE SAEGER, 2013).

As vantagens importantes dessas partículas, em comparação com outros marcadores fluorescentes convencionalmente aplicados incluem a elevada sensibilidade (não apresentam auto-fluorescência de outros materiais biológicos), longa vida de prateleira, registro permanente (não desbotamento), e os baixos custos (ZIJLMANS *et al.*, 1999). Vários bioensaios, incluindo os dispositivos de fluxo lateral, foram desenvolvidos e demonstraram a

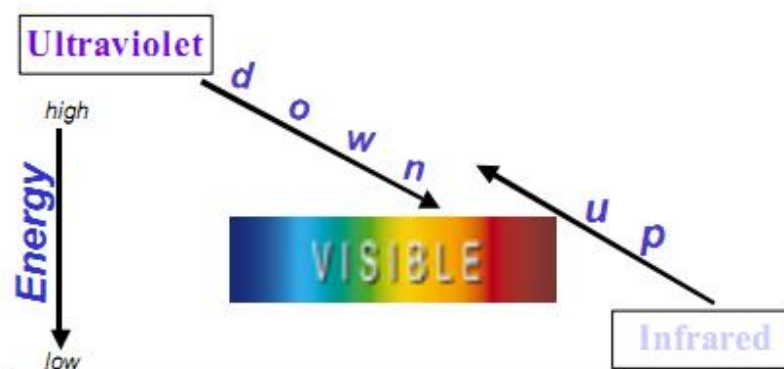
utilidade dessa tecnologia de detecção para ácidos nucleicos (CORSTJENS *et al.*, 2001), gonadotrofina coriônica humana - hCG (HAMPL *et al.*, 2001), estradiol (KUNINGAS *et al.*, 2006), interferon γ (CORSTJENS *et al.*, 2008a), *Escherichia coli* (NIEDBALA *et al.*, 2001), *Streptococcus pneumonia* (ZUIDERWIJK *et al.*, 2003), *Yersinia pestis* (YAN *et al.*, 2006), vírus respiratório sincicial (MOKKAPATI *et al.*, 2007), *Brucella* (QU *et al.*, 2009), hepatite B (LI *et al.*, 2009) e HIV, hepatite C e tuberculose (CORSTJENS *et al.*, 2007).

Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas fosforescentes $Y_2O_3:S:Yb^{3+}, Er^{3+}$ de 400 nm aplicadas no método UCP- LF



Fonte: Corstjens *et al.* (2014b, p.4).

Figura 5 – Princípio de *up-conversion*; Processo multi-fóton que converte luz de baixa energia (infravermelho) em luz de alta energia (radiação visível). O íon Er^{3+} emite luz verde (550nm)



Fonte: Adaptado de van de Rijke *et al.* (2001, p.273).

No entanto, o formato aplicado ainda não era viável para distribuição, apresentando-se limitado devido ao fato de que alguns dos reagentes necessitavam de refrigeração. Além disso, a exigência de um passo de sonicação adicionava complexidade ao ensaio. O transporte em todo o mundo à temperatura ambiente dos reagentes do ensaio, bem como a disponibilidade de pequenos scanners para analisar as tiras do UCP-LF são dois passos importantes no sentido de torná-lo compatível com aplicações point-of-care (POC) em ambientes remotos e pobres em recursos para identificar precisamente de baixas (30 pg CAA / mL de soro; equivalente a cerca de 10 pares de vermes) a altas infecções por *Schistosoma* (VAN DAM *et al.*, 2013).

Nesse contexto, recentemente ele foi melhorado e convertido para um formato com reagentes secos ('dry'), que permite o armazenamento e transporte do teste no mundo inteiro, à temperatura ambiente. Os resultados do UCP-LF CAA no formato 'dry' e do CAA-ELISA correlacionaram-se muito bem em concentrações de CAA acima de 300 pg / ml. Entretanto, em concentrações menores, o UCP-LF CAA indicou uma melhor performance que o CAA-ELISA, além de mostrar-se superior quanto à velocidade e à simplicidade de utilização (VAN DAM *et al.*, 2013).

Nesse mesmo estudo, foi empregado o leitor portátil UPlink (MOKKAPATI *et al.*, 2007) para analisar as tiras do UCP-LF com êxito. Os resultados obtidos foram validados pela re-análise das tiras com diferentes equipamentos: o leitor Packard FluoroCount™ modificado (adaptado com um laser infravermelho - 980 nm) para ler as tiras do ensaio de fluxo lateral (NIEDBALA *et al.*, 2001) e o leitor portátil pequeno e leve UCP-Quant, recentemente disponível comercialmente bem adequado para testes em ambientes de baixos recursos (VAN DAM *et al.*, 2013).

Recentemente, Corstjens *et al.*, (2014a) mostraram que o formato UCP-LF também permite a detecção de CAA na urina (e potencialmente também na saliva) e após a aplicação de um passo extra, que se refere à concentração da amostra utilizando dispositivos de filtros membranares centrifugáveis, mostra uma precisão quase absoluta para diagnosticar esquistossomose.

A estabilidade do antígeno alvo também pode afetar a sensibilidade do ensaio e a fração de carboidrato do CAA tem demonstrado ser um componente estável na urina e no sangue, sendo detectável após múltiplos passos de congelamento-descongelamento ou depois do armazenamento das amostras clínicas à temperatura ambiente durante períodos prolongados de tempo (CORSTJENS *et al.*, 2014a).

Recentemente, um estudo realizado na China, numa área caracterizada por uma prevalência muito baixa de *S. japonicum*, aplicou o UCP-LF CAA utilizando 2mL de amostra de urina e 0,5mL de soro, os quais demonstraram sensibilidades iguais a 93% e 77%, respectivamente, contra um padrão ("ouro") de positividade de infecção combinado, definido como sendo positivo se o indivíduo apresentou ovos de *S. mansoni* e / ou foi positivo no ensaio UCP-LF CAA (soro e/ou urina), ressaltando-se que, quando considerada a abordagem diagnóstica de associação da detecção de CAA na urina e/ou no soro, esse ensaio resultou uma sensibilidade de 100%. Em contraste, o método parasitológico Kato-Katz demonstrou sensibilidade de 13%, mesmo realizando a leitura de três lâminas da amostra de fezes de cada indivíduo (VAN DAM *et al.*, 2014a).

Outro estudo recente, realizado em contextos de grande endemia nas Filipinas para *S. japonicum* e no Camboja para *S. mekongi*, aplicou o UCP-LF CAA utilizando 10 e 250 µL de amostra de urina, os quais demonstraram sensibilidades iguais a 44% e 70% (Filipinas), contra um padrão ouro definido pelo método Kato-Katz (leitura de duas lâminas), e 42% e 70% (Camboja), contra um padrão ("ouro") de positividade de infecção combinado, definido como sendo positivo se o indivíduo apresentou ovos de *S. mansoni* e / ou foi positivo no ensaio CAA UCP-LF e / ou foi positivo no POC-CCA, respectivamente. Nesse estudo, o método parasitológico Kato-Katz demonstrou sensibilidades de 91% (primeira lâmina) e de 81% (segunda lâmina) nas Filipinas e 90% no Camboja. Este foi realizado com a leitura de duas lâminas da amostra de fezes de cada indivíduo nas Filipinas e pela leitura de uma lâmina de três amostras de fezes de cada indivíduo no Camboja (VAN DAM *et al.*, 2014b).

O uso de um anticorpo monoclonal específico para o CAA em combinação com uma plataforma de detecção ultra-sensível poderá, assim, resultar em melhorias de sensibilidade sem comprometer a especificidade (VAN DAM *et al.*, 2013; CORSTJENS *et al.*, 2008b, 2014a). Essa sensibilidade muito elevada em combinação com o uso de urina como amostra clínica tornará, provavelmente, uma técnica não invasiva ideal para a determinação da prevalência de esquistossomose em áreas de baixa endemicidade, como por exemplo, no Brasil após o impacto dos Programas de Controle de longo prazo, principalmente se levarmos em consideração a inclusão do Brasil no programa de eliminação da esquistossomose da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar o ensaio *Up- Converting Phosphor Lateral Flow* que detecta o Antígeno Anódico Circulante (UCP-LF CAA) para o diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni* em uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará com outros métodos de diagnóstico.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar ovos de *S. mansoni* através do método parasitológico de Kato-Katz em amostras de fezes dos moradores da localidade de Bananeiras, Capistrano-CE;
2. Detectar e quantificar o CAA de *S. mansoni* pelo método UCP-LF em amostras de urina dos moradores da localidade de Bananeiras, Capistrano-CE;
3. Determinar a prevalência da esquistossomose mansoni em Bananeiras-Capistrano-CE, através das diferentes técnicas utilizadas;
4. Comparar o UCP-LF CAA com o Kato-katz e com o POC-CCA, avaliando as diferenças de positividade e seus respectivos desempenhos através do cálculo dos valores de sensibilidade;
5. Avaliar os níveis de CAA antes e após o tratamento em amostras de urina dos moradores da localidade de Bananeiras, Capistrano-CE;
6. Correlacionar os resultados do método UCP-LF CAA com os do POC-CCA, antes e após o tratamento, em amostras de urina dos moradores da localidade de Bananeiras, Capistrano-CE.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, longitudinal e intervencionista com dois cortes transversais.

3.2 Área e população de estudo

O estudo foi realizado na localidade de Bananeiras, município de Capistrano (Figura 6). Este se localiza no sopé da serra do maciço do Baturité, a 156 metros de altitude e situa-se a 100 km de Fortaleza. Com área de 222,550 km² conta com uma população de 17.062 habitantes (IBGE, 2010).

Figura 6 – Mapa do Estado do Ceará localizando o Município de Capistrano. À direita, vista ampliada mostrando as áreas limítrofes do município



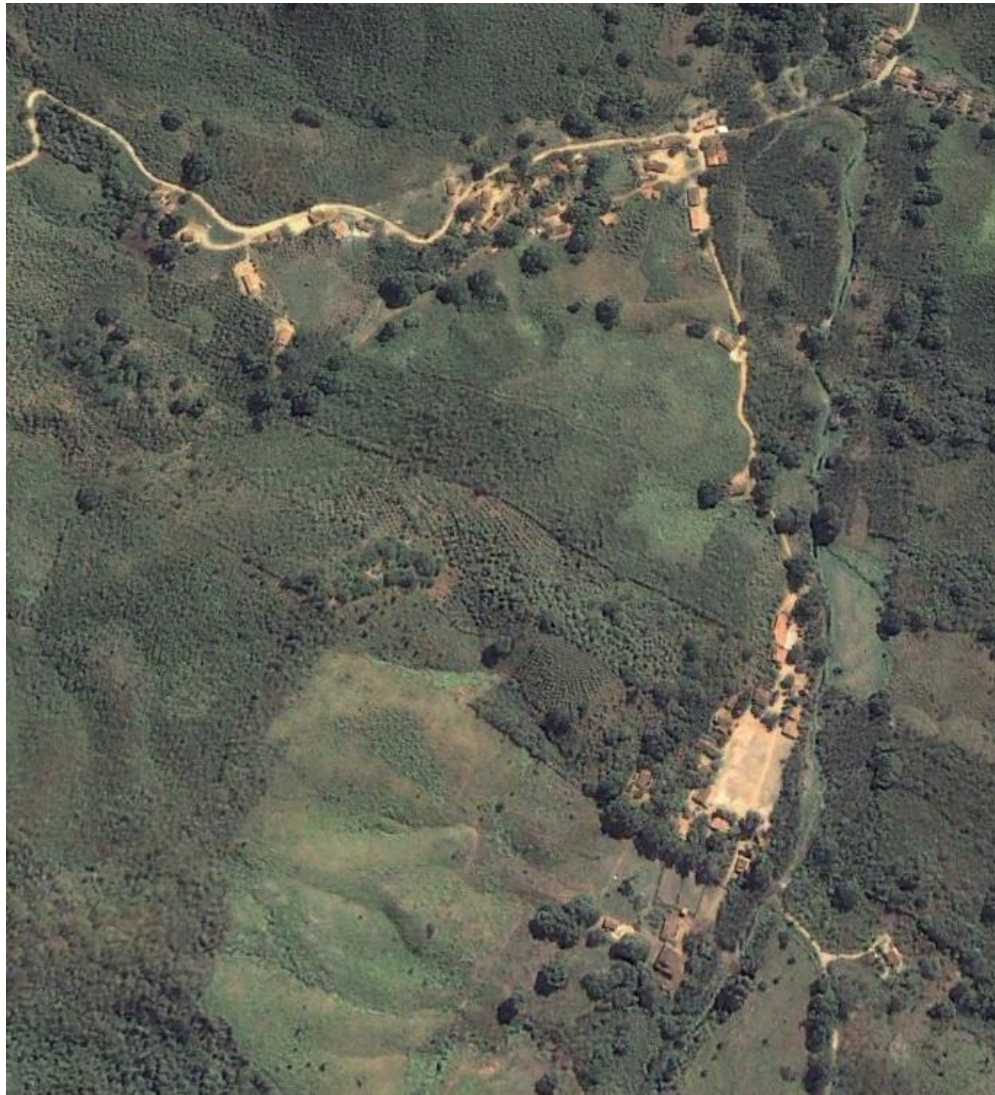
Fonte: Wikipédia, acessado em 11 de agosto de 2014; Adaptado do Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA).

Bananeiras é uma localidade rural (Figuras 7) composta por 297 habitantes, segundo um censo porta a porta realizado pela equipe do LPBM em Março de 2013, que tem sua fonte

de renda baseada, principalmente, na agricultura de subsistência, como também no comércio local.

O Rio Aracoiaba é a principal fonte de água, além de poços artesianos. A maioria das casas possui fossa sanitária e banheiro, porém a comunidade apresenta precárias condições de infra-estrutura e ausência de saneamento (Figuras 8). Os cuidados básicos de saúde estão a cargo de uma equipe de Saúde da Família que atende no único Posto de Saúde da localidade uma vez por semana e, se necessário (maior complexidade), estes são encaminhados para a sede de Capistrano.

Figura 7 – Localidade de Bananeiras; Vista de satélite, 2013



Fonte: Google Earth, 2013.

A região é endêmica para a esquistossomose e isso vem sendo documentado desde os primeiros inquéritos realizados no Ceará (PECE, 1976). Essa localidade apresentou casos positivos nos anos de 2008, 2009 e 2010, mas não foi trabalhada pelo PCE nos anos seguintes, o que reforçou a escolha por essa área de estudo (CEARÁ, 2014).

Figura 8 – Fotos da Localidade de Bananeiras; Etapa de assinatura do TCLE e aplicação dos questionários, 2013



Fonte: Elaboração da autora e Arquivos do LPBM.

3.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os moradores da localidade acima mencionada, com idade igual ou superior a 02 anos, de ambos os sexos, que concordaram em participar do projeto mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). No caso dos indivíduos menores de idade, a autorização para participação da pesquisa ficou a cargo dos pais ou do responsável pelas crianças.

3.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos que não aderiram ao tratamento, os que não disponibilizaram alguma das amostras biológicas solicitadas e/ou que não as entregaram em quantidade suficiente para a realização dos procedimentos.

3.3 Aplicação de TCLE e questionário socioambiental

Foi realizada uma palestra sobre esquistossomose para a comunidade, quando foram repassadas algumas informações importantes sobre a doença. Foi explicada também a pesquisa em si, assim como o Termo de Consentimento e esclarecidas todas as dúvidas. Após o conhecimento dos objetivos, eventuais riscos e importância da pesquisa, os indivíduos que concordaram com a participação no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para os indivíduos menores de idade que participaram da pesquisa foi necessária a autorização para a participação destes, ficando a cargo dos pais ou responsáveis a assinatura do Termo de Consentimento dessas crianças e também a resposta ao questionário socioambiental destas. Contudo ainda, o indivíduo menor de idade que sabia ler e escrever assinou o Termo de Assentimento (Apêndice B).

Foi aplicado um questionário socioambiental aos participantes da pesquisa, em visitas domiciliares. Esse questionário é composto por perguntas a respeito das condições demográficas, sociais, de saúde do indivíduo e sobre alguns aspectos da esquistossomose (Apêndice C).

3.4 Coleta e transporte do material biológico

3.4.1 Coleta de fezes e de urina

Foram distribuídos, na casa de cada participante da pesquisa, frascos de coleta (coletor universal), rotulados e identificados: um frasco para fezes (com espátula) e outro para urina (estéril), constando o nome do morador, número de identificação e a data da coleta.

Decorridas 24 horas, os frascos foram recolhidos e levados ao posto de saúde da localidade, onde foram confeccionadas 03 lâminas de Kato-Katz da amostra de fezes de cada indivíduo. Do frasco com urina foi retirada uma alíquota de 5mL para posteriores análises

pelo método UCP-LF CAA. Essas alíquotas devidamente identificadas foram acondicionadas em criotubos, e estes foram transportados sob refrigeração e armazenados à temperatura de -20°C no Laboratório de pesquisa em Parasitologia e Biologia de Moluscos (LPBM) da UFC até a data do transporte para o *Leiden University Medical Center* (LUMC) em Leiden-Holanda. As amostras de urina foram coletadas em dois períodos: antes e após o tratamento, conforme descrito no item 3.6.

Após a confecção das lâminas pelo Kato-Katz e a retirada das alíquotas de urina, o restante do material foi descartado em sacos plásticos e levado para incineração junto ao lixo biológico do Hospital Universitário Walter Cantídio/ UFC.

3.4.2 Transporte do material biológico para realização do método UCP-LF CAA

As alíquotas de urina (5mL) coletadas ao longo do estudo, foram transportadas para o Departamento de Parasitologia do *Leiden University Medical Center* (LUMC), ficando sob a responsabilidade do pesquisador e professor Dr. Govert J. van Dam. Essas amostras foram utilizadas para a execução do método UCP-LF CAA; ensaio este desenvolvido por seu grupo de pesquisa.

Tratou-se de um transporte aéreo, realizado por empresa especializada em transporte de material biológico. O conteúdo enquadrou-se na descrição de substâncias biológicas, categoria B, UN3373 (não infectante), sendo transportado para fins de diagnóstico em pesquisa científica sob condição de congelamento mantido por gelo seco (UN1845 – Substâncias Perigosas Diversas - 9). As embalagens utilizadas seguiram as determinações da instrução de embalagem 650 da norma *International Air Transport Association* (IATA), estando os volumes devidamente identificados (Figura 9).

Figura 9 – Fotos do acondicionamento dos criotubos contendo as amostras de urina para transporte internacional conforme a norma IATA; a. Embalagens terciárias; b. Embalagens primárias (bags)



Fonte: Elaboração da autora, 2014.

3.5 Métodos de diagnóstico

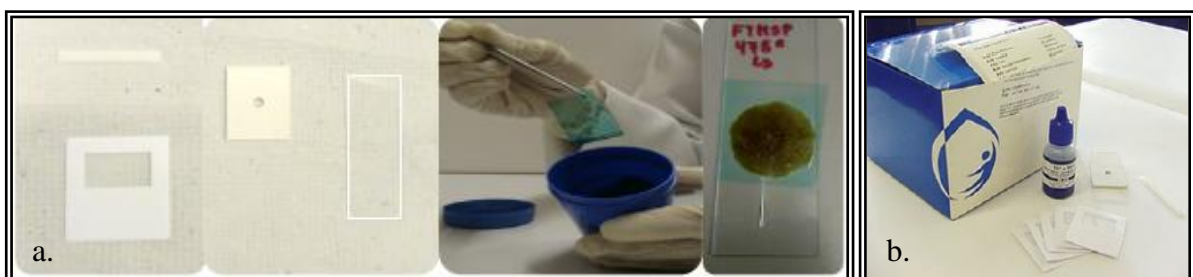
Foram executados dois tipos de métodos de diagnóstico: método parasitológico de fezes e ensaio UCP-LF CAA em amostras de urina. Além disso, os dados obtidos pelo método de diagnóstico que detecta o antígeno catódico circulante, POC-CCA, oriundos de Leal (2014), foram utilizados para análises comparativas desse estudo, conforme descrito nos itens 3.5.3 e 3.7.

3.5.1 Método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972)

Esse método foi realizado utilizando o Kit Helm Test[®] (Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil). As lâminas foram preparadas no próprio posto de saúde da localidade. Estas foram levadas para uma estufa a 40°C por 2 horas e em seguida foram embaladas e levadas para o LPBM onde foi realizada a leitura das mesmas ao microscópio óptico, percorrendo toda a superfície delimitada pela lamínula, fazendo a contagem do número de ovos de *S. mansoni*.

Foram preparadas três lâminas de cada amostra de fezes, através dessa técnica (Figura 10), 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 ($OPG \chi = \text{Soma do n}^\circ \text{ de ovos} \times 24 / \text{n}^\circ \text{ lâminas analisadas}$) foi utilizada para determinação da intensidade da infecção por *S. mansoni*.

Figura 10 – Preparação do método de Kato – Katz, pelo Kit Helm Test[®]



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

Fonte: Arquivos do LPBM.

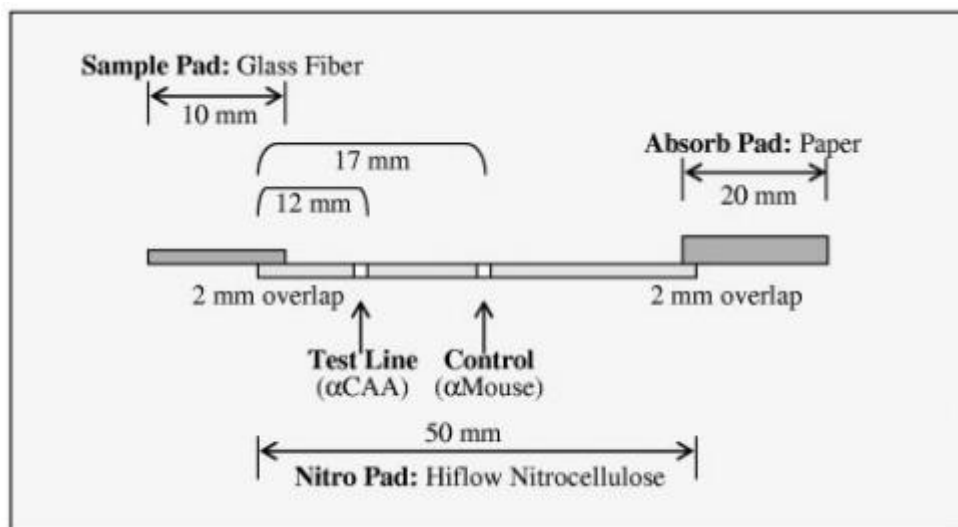
3.5.2 Ensaio Up – Converting Phosphor - Lateral Flow – UCP-LF

A execução desse ensaio foi realizada nos laboratórios de Pesquisa do Departamento de Parasitologia da *Leiden University*, sob a supervisão e orientação do Prof ° Dr. Govert J. van Dam, para onde as amostras biológicas foram enviadas.

3.5.2.1 Produção das tiras (strips) e do conjugado UCP^{MaCAA}

Grandes lotes de tiras para o ensaio de fluxo lateral (até 2000) foram preparados de acordo com os protocolos descritos por Corstjens *et al.* (2001, 2008b). A linha de teste (T) foi composta de 200 ng do anticorpo monoclonal anti-CAA produzido em camundongo 147-3G4 ($MaCAA$, Dept. de Parasitologia, LUMC) e a linha de Controle do fluxo (*Flow-Control-FC*) continha 100 ng do anticorpo anti-camundongo produzido em cabra (M8642, Sigma-Aldrich). As tiras foram armazenadas secas em recipientes de plástico fechados com sílica. Um esquema da tira está representado na figura 11.

Figura 11 – Ilustração da tira (strip) específica para CAA utilizada no método UCP- LF



Fonte: Corstjens *et al.* (2008b, p.172).

O anticorpo monoclonal anti-CAA 147-3G4 (LUMC, Parasitologia) foi acoplado às nanopartículas fosforescentes - 400 nm (OraSure Technologies, Inc., Bethlehem, PA), como descrito por Corstjens *et al.* (2001), utilizando uma carga de conjugação de 25ng de anticorpo por mg das partículas. O conjugado resultante (UCP^{MaCAA}) é estável durante pelo menos 6 meses sob refrigeração (4°C). Diretamente antes usar, a solução estoque de conjugado foi homogeneizada, e uma quantidade desejada foi sonicada (1 minuto, *water bath sonicator*, 100

W) e diluída em tampão de ensaio a 1 ng /mL. O tampão de ensaio de Fluxo Lateral utilizado é o *High Salt Lateral Flow* (HSLF: 100 mM de HEPES pH 7,5; 270 mM NaCl; 0,5% (p/v) de Tween 20; 1% (p/v) de soro de albumina bovina.

3.5.2.2 *Pré - tratamento das amostras*

Todas as amostras de urina testadas por esse ensaio, bem como os padrões e controles positivo e negativo, foram primeiramente pré-tratadas com igual volume de ácido tricloroacético (TCA) - 4% (p/v), para remover proteínas interferentes e para dissociar os imunocomplexos (DE JONGE; FILLIÉ; DEELDER, 1987). Pipetou-se 2mL de urina/padrões/controles e adicionou-se 2mL de TCA (4%). O volume de 4 mL foi dividido em dois tubos do tipo eppendorf de 2mL. Após agitação em vortex por 3 segundos, incubou-se a mistura 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante resultante (4mL) foi utilizado para a etapa de concentração da amostra.

3.5.2.3 *Concentração das amostras*

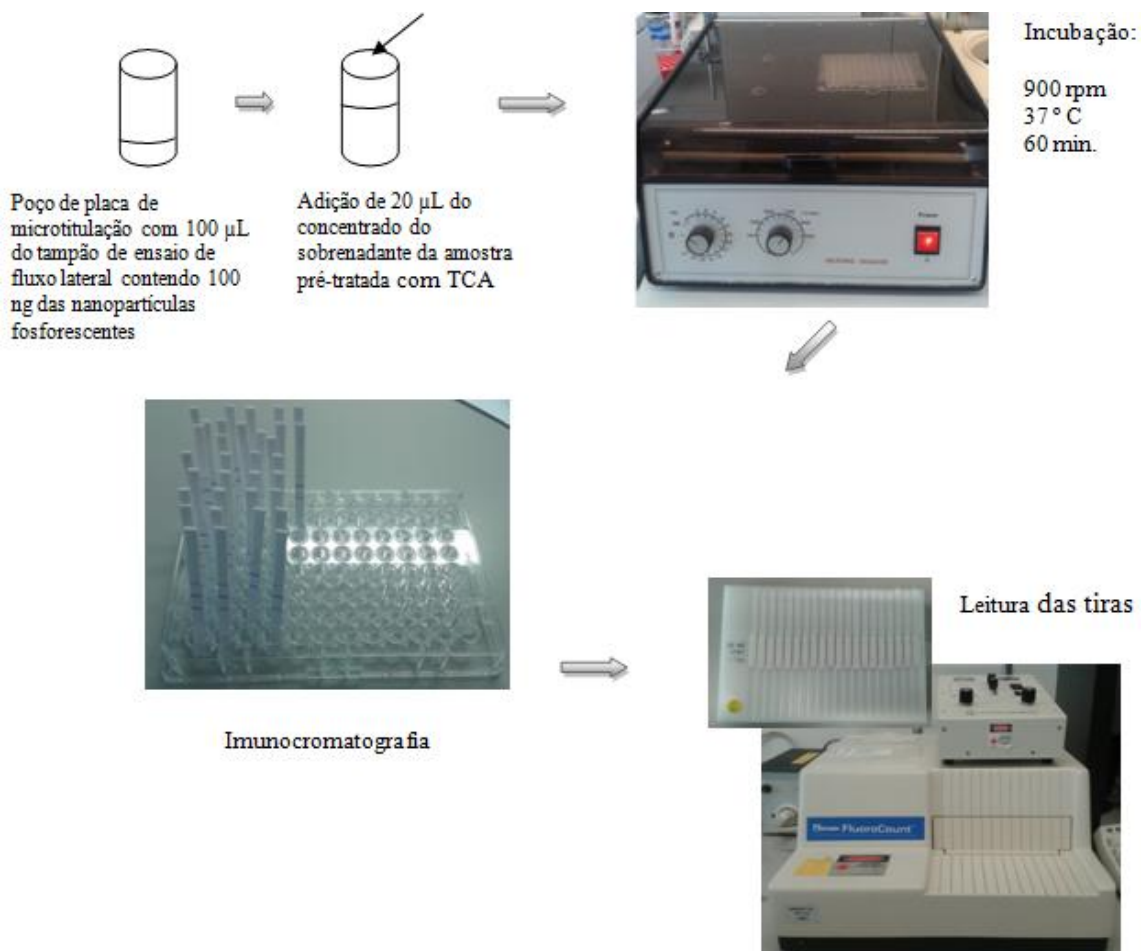
Para aumentar a sensibilidade analítica um passo de concentração foi adicionado. Após o pré-tratamento com ácido tricloroacético, 4 mL do sobrenadante das amostras clínicas foi adicionado em dispositivos de filtro centrifugáveis com membranas de tamanho específico (cut-off) de 10kDa de massa molecular. Foram utilizados dispositivos para 4mL (Amicon Ultra- 4mL Centrifugal Filters, Millipore Corp.; Billerica, MA, USA). Estes foram centrifugados durante 1 hora à 4.000 rpm, reduzindo o volume para cerca de 20 - 30 µL. 20 µL do concentrado foram utilizados para execução do ensaio.

3.5.2.4 *Ensaio UCP-LF CAA*

A figura 12 mostra uma visão geral do ensaio UCP-LF. O ensaio consiste de quatro passos: (I) 20 µL do concentrado do sobrenadante da amostra pré-tratada com TCA foram misturados com 100 µL do tampão de ensaio de fluxo lateral contendo 100 ng de nanopartículas fosforescentes específicas para o CAA (1ng/ µL) em uma placa de microtitulação (ou em um tubo de 1.5 mL); (II) Essa mistura foi incubada em um agitador orbital (900 rpm) à 37 ° C durante 60 minutos; (III) Imediatamente após a incubação, as tiras

identificadas com o número da amostra foram inseridas com a almofada da amostra para dentro do poço da placa de microtitulação da amostra correspondente, permitindo que a cromatografia continuasse até que as tiras estivessem secas; e (IV) Finalmente, foi realizada a leitura das tiras com o leitor de placas de microtitulação Packard FluoroCount™ modificado (adaptado com um laser infravermelho - 980 nm) para ler as tiras do ensaio de fluxo lateral (NIEDBALA *et al.*, 2001).

Figura 12 – Visão geral do ensaio de fluxo lateral baseado na *up-conversion* de nanopartículas fosforescentes (*Up-Converting Phosphor - Lateral Flow – UCP-LF*)

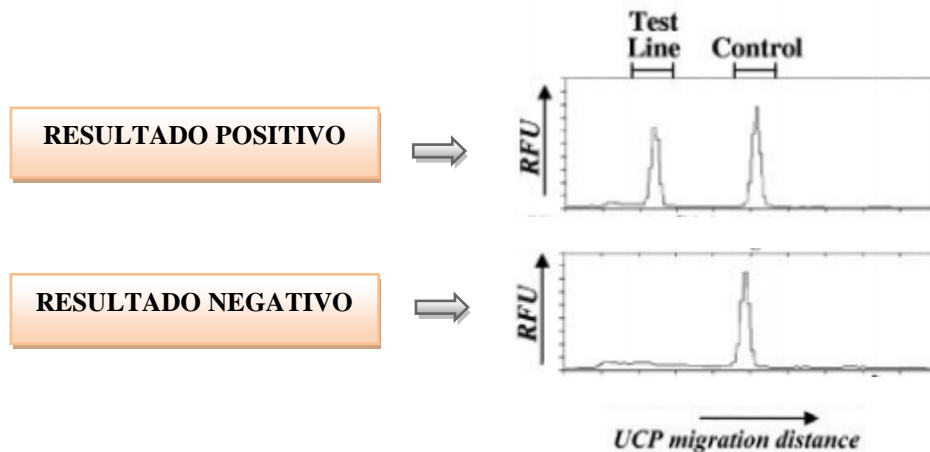


Fonte: Elaboração da autora, 2014.

Os sinais são medidos como Unidades de Fluorescência Relativa (*Relative Fluorescent Units - RFUs*) que representam a intensidade da luz verde emitida por excitação das nanopartículas capturadas nas linhas T e FC e detectada com um fitro de 550nm. O software utilizado para a análise das tiras (OTI-Connect, OraSure Technologies Inc.) inclui algoritmos para correção de fundo (*background*) e determinação das áreas de pico (T e FC). Para

padronização e expressão quantitativa, os sinais da linha Teste (T) foram normalizados para os sinais da linha do Controle de Fluxo (FC) de cada tira individualmente e os resultados do ensaio UCP-LF são expressos em valores de razão (T/FC). Diluições em série do antígeno parcialmente purificado, ou seja, a fração solúvel em TCA do antígeno de verme adulto de *Schistosoma* (AWA-TCA) (DEELDER *et al.*, 1976), contendo aproximadamente 3% (p/p) de CAA, em urina negativa, foram ensaiadas com cada conjunto de amostras clínicas. As concentrações do CAA são determinadas por valores de razão T/FC relativos à curva padrão obtida pela série de AWA-TCA, sendo expressas em pg CAA/mL de urina, como descrito por Polman *et al.* (2000). Os cut-offs do ensaio foram decididos de acordo com Corstjens *et al.* (2014a) usando 0,1 pg / ml de urina (UCAA2000 com reagentes ‘molhados’) como o menor limite de detecção (*Lower Limit of Detection* - LOD), e 0,05 pg / ml de urina como o LOD se o ensaio tivesse sido realizado com múltiplos experimentos (triplicatas ou mais) em condições laboratoriais ideais. A região entre os dois LOD foi designada como ‘irresoluto’, indicando que as amostras eram suspeitas de ser positivas, mas para determinar o status verdadeiramente positivo ou negativo, as amostras precisariam ser testadas novamente, de preferência usando um volume de amostra ainda maior. A ilustração dos resultados positivo e negativo nesse ensaio são mostrados na figura 13.

Figura 13 – Ilustração dos resultados positivo e negativo no método UCP- LF



RFU: *Relative Fluorescent Units* (Unidades de Fluorescência Relativa).

Fonte: Adaptado de Corstjens *et al.* (2008b, p.172).

3.5.3 Detecção do Antígeno Catódico Circulante (CCA) – POC-CCA

Os dados obtidos pelo POC-CCA relativo às 128 amostras que compuseram o grupo de análise desse estudo, antes e após o tratamento, foram oriundos de Leal (2014), e fazem parte de um projeto de mestrado, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, na mesma

população de forma simultânea e ao qual esse estudo está vinculado. Estes foram utilizados para as análises comparativas desse estudo (prevalência, diferença de positividade e desempenho, indicado pela sensibilidade).

Para a detecção do CCA foi realizado o teste *Point-of-Care (POC)* disponível comercialmente, Bilharzia (*Schistosoma*), que detecta esse antígeno na urina (*Rapid Medical Diagnostics*, Pretoria, África do Sul), segundo as instruções do fabricante (Figura 14). Os possíveis status dos resultados desse teste são negativo, 'traço' e positivo, de forma similar a de outros grupos que trabalharam com o POC-CCA para o diagnóstico de *S. mansoni* em diferentes contextos africanos (COLLEY *et al.*, 2013; COULIBALY *et al.*, 2013b).

Figura 14 – Kit Bilharzia (*Schistosoma*) da *Rapid Medical Diagnostics*[®] (Pretoria, África do Sul)



Fonte: Elaboração da autora, 2014.

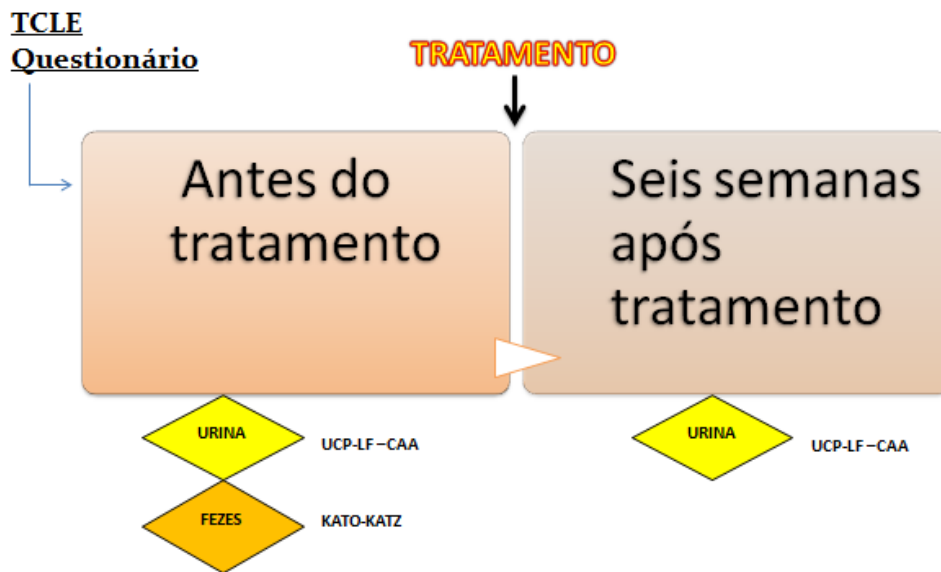
3.6 Tratamento e avaliação pós - tratamento

Todos os participantes foram convidados a participar do tratamento (coletivo) para esquistossomose, realizado no posto de saúde de Bananeiras. Conforme a recomendação do Ministério da Saúde, os indivíduos com idade abaixo ou igual a 15 anos foram tratados com praziquantel 60 mg / kg / DU, e no caso de indivíduos acima dessa idade, na dosagem de 50mg / kg / DU. Esse medicamento foi disponibilizado pela Secretaria de Saúde do Estado do

Ceará. A prescrição e administração foram supervisionadas pelo médico e enfermeiros da Atenção Básica de Saúde do Município de Capistrano.

Na avaliação após o tratamento foram coletadas amostras de urina seis semanas após a administração do praziquantel. Avaliou-se a eficiência do tratamento farmacológico através da detecção e quantificação do CAA. A figura a seguir esquematiza (Figura 15) as etapas do estudo.

Figura 15 – Ilustração esquemática das etapas do estudo



Fonte: Elaboração da autora, 2014.

3.7 Análise estatística

Os dados foram digitados em uma planilha Excel 2007 (Microsoft; Washington, EUA). As análises estatísticas foram feitas com os programas Graphpad Prism 5 (Graphpad Software Inc.; California, EUA) e SPSS versão 20 (IBM Corp.; Armonk, EUA).

A sensibilidade dos testes de diagnóstico foi calculada e usada para indicação de desempenho do teste, seguindo a abordagem descrita anteriormente por van Dam *et al.* (2014a, 2014b). Por essa razão, aplicamos um padrão ("ouro") de positividade de infecção combinado, definido como sendo positivo se o indivíduo apresentou ovos de *S. mansoni* e / ou foi positivo no ensaio UCP-LF CAA e / ou foi positivo no POC-CCA. Essa abordagem implica que, por definição, as especificidades dos testes individuais foram de 100%. Isso poderia ser uma ligeira superestimação, mas foi considerado válido por causa das especificidades muito elevadas dos ensaios utilizados para detecção dos antígenos circulantes

(Midzi *et al.*, 2009). Além disso, as categorias 'irresoluto' e 'traço' foram definidas para os resultados do UCP-LF CAA e do POC-CCA, respectivamente, e analisadas separadamente, seguindo a abordagem descrita anteriormente por Coulibaly *et al.* (2013b) e por van Dam *et al.* (2014b).

Os testes estatísticos não-paramétricos Spearman's rho e Wilcoxon foram utilizados para a correlação entre os resultados dos testes UCP-LF CAA e POC-CCA e para analisar o comportamento das concentrações de CAA antes e após o tratamento, respectivamente. Diferenças foram consideradas significativas em um $P < 0,05$.

Para obter informações mais exatas sobre em que faixa etária da população foram localizados mais indivíduos infectados, os dados também foram analisados por grupos etários (2-9, 10-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 e ≥ 60 anos).

3.8 Aspectos éticos

Todas as pessoas foram informadas sobre seus direitos que são assegurados de acordo com os preceitos éticos previstos na Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e receberam os devidos esclarecimentos sobre os objetivos da pesquisa, do caráter participativo, e a garantia de que não haverá divulgação de nomes ou de qualquer outra informação que ponha em risco a sua privacidade, pois os resultados serão divulgados sob a forma de gráficos e dados estatísticos.

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará e foi aprovado sob o número do parecer: 480.719 e CAAE: 22932713.7.0000.5054, conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP (Anexo A).

Obedecendo às normas éticas que regem a pesquisa em saúde e em seres humanos, o pesquisador antes apresentou e explicou o objetivo da pesquisa e após o esclarecimento e o consentimento por parte do entrevistado mediante a assinatura do TCLE, o questionário foi respondido e as amostras biológicas foram coletadas. O participante teve autonomia e liberdade para desistir a qualquer momento de participar da pesquisa. No caso dos indivíduos menores de idade, a autorização na participação da pesquisa ficou a cargo dos pais ou do responsável pelas crianças.

Os pacientes que se apresentaram positivos em algum dos métodos de diagnóstico utilizados foram avisados pessoalmente e receberam o tratamento específico para esquistossomose. Cada paciente recebeu a dosagem da medicação adequada de acordo com seu peso e idade.

4 RESULTADOS

De 297 habitantes da localidade, 285 indivíduos aceitaram participar do estudo, dos quais 159 receberam o tratamento. Destes 128 entregaram as amostras de urina e fezes requisitadas antes e após o tratamento.

A população de estudo foi composta de 52 indivíduos do sexo masculino e 76 do sexo feminino com mediana de idade de 19 anos (Tabela 1).

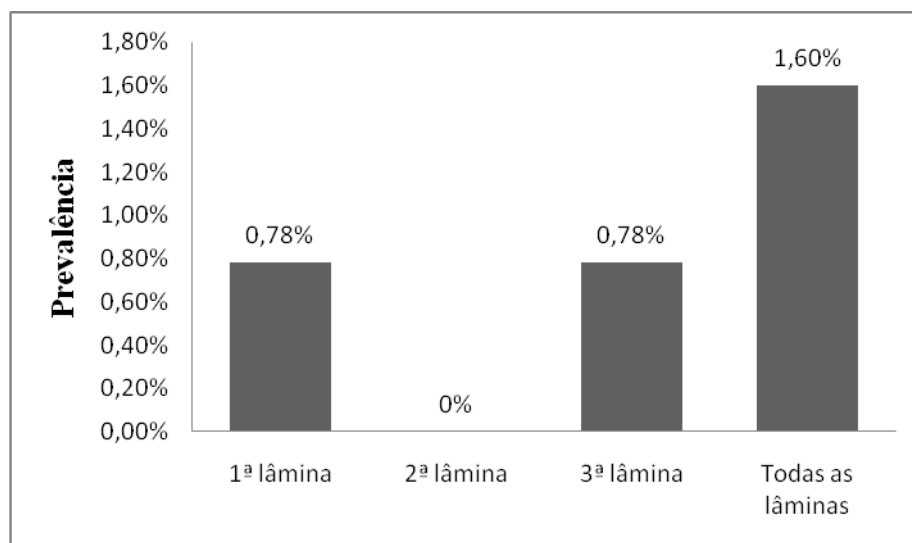
Tabela 1 – Características da população de estudo quanto ao sexo e à idade (n=128)

Gênero (n° m./n° f.)	52/76
Idade em anos (mediana/intervalo)	19/2-87

4.1 Método parasitológico Kato-Katz

Para o método de Kato – Katz foram preparadas três lâminas de cada amostra fecal. Foram encontradas 2 (1,6%) amostras positivas para *S. mansoni*, com um positivo na primeira lâmina e um na terceira lâmina (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição da prevalência, por lâmina analisada e segundo três lâminas, através do método de Kato-Katz – Bananeiras, Capistrano - CE



A intensidade da infecção individual de ambos os pacientes, avaliada através do cálculo da média (χ) da contagem de ovos nas três lâminas analisadas neste método foi de 8 ovos por grama de fezes (OPG), visto que os dois apresentaram apenas um ovo por amostra, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição do número de ovos de *S. mansoni*, por lâmina analisada, e carga parasitária, expressa em média do número de ovos por grama de fezes (χ) dos indivíduos positivos no Kato-Katz – Bananeiras, Capistrano - CE

Paciente	Kato-Katz			OPG(χ)
	L1	L2	L3	
A	0	0	1	8
B	1	0	0	8

L1: Lâmina 1; L2: Lâmina 2; L3: Lâmina 3; A média do OPG foi calculada pela multiplicação do número de ovos encontrados pelo fator de conversão 24 dividido pelo número de lâminas analisadas.

4.2 Ensaio UCP-LF CAA

Para esse ensaio utiliza-se pontos de corte (cut-off). Estes foram decididos de acordo com Corstjens *et al.* (2014a) para UCAA2000 com reagentes ‘molhados’, de modo que o resultado foi considerado positivo para concentrações de CAA superiores a 0,10 pg / ml de urina e negativo para níveis inferiores a 0,05 pg / ml de urina. Os indivíduos com resultados na região entre os dois valores foram designados como 'irresolutos'.

4.2.1 Antes do tratamento

Das 128 amostras de urina, 44 (34,4%) foram positivas, 06 (4,7%) irresolutas e 78 (60,9%) negativas para *S. mansoni*.

4.2.2 Após o tratamento

Das 128 amostras de urina, 35 (27,4%) foram positivas, 30 (23,4%) irresolutas e 63 (49,2%) negativas para *S. mansoni*.

4.2.3 Comparação do UCP-LF CAA antes e após o tratamento

Das 44 amostras de urina positivas antes do tratamento, 09 tornaram-se negativas para *S. mansoni*, 08 foram irresolutas e 27 mostraram-se ainda positivas.

Das 06 amostras de urina irresolutas antes do tratamento, 05 tornaram-se negativas para *S. mansoni* e 01 mostrou-se positiva.

Das 78 amostras de urina negativas antes do tratamento, 49 mantiveram-se negativas para *S. mansoni*, 22 foram irresolutas e 07 mostraram-se positivas.

Esses dados juntamente com as prevalências antes e após o tratamento segundo o ensaio UCP-LF CAA são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação do UCP-LF CAA antes e seis semanas após o tratamento na detecção da esquistossomose mansoni (n= 128) – Bananeiras, Capistrano - CE

CAA Pré – tratamento	Total	CAA Pós - tratamento		
		Positivo	Irresoluto	Negativo
Positivo	44	27	8	9
Irresoluto	6	1	0	5
Negativo	78	7	22	49
Total testado	128	35	30	63
Prevalência	34,4%	27,4%		

4.3 POC-CCA

4.3.1 Antes do tratamento

Das 128 amostras de urina, 08 (6,25%) foram positivas, 16 (12,5%) traços e 104 (81,25%) negativas para *S. mansoni*.

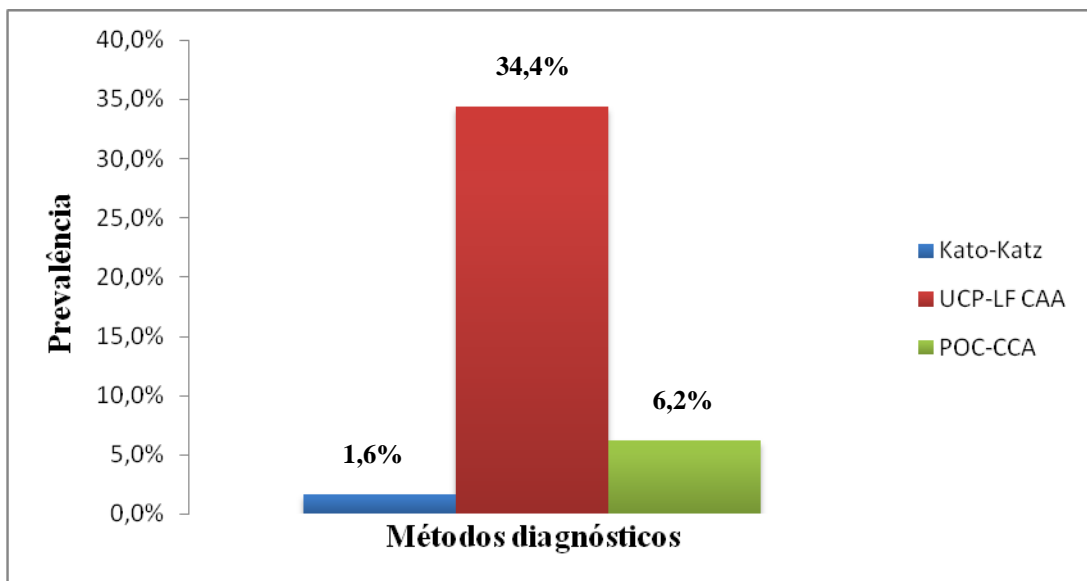
4.3.2 Após o tratamento

Todas as 128 amostras de urina foram negativas para *S. mansoni* seis semanas após o tratamento.

4.4 Prevalências determinadas segundo os diferentes métodos

Os métodos avaliados apresentaram índices de prevalência diferentes. A maior prevalência encontrada foi determinada segundo o método UCP-LF CAA que detectou percentual bem mais elevado de casos em relação aos demais, como mostra o gráfico 2.

Gráfico 2 – Prevalências da esquistossomose mansoni, detectadas através dos métodos de Kato-Katz, UCP-LF CAA e POC-CCA (n= 128) – Bananeiras, Capistrano - CE



4.5 Comparação entre os métodos

4.5.1 UCP-LF CAA x Kato – Katz

Da avaliação através dos métodos Kato – Katz e UCP-LF CAA, 46 foram positivos, sendo 02 positivos no Kato – Katz e 44 no UCP-LF CAA, com nenhum paciente positivo em ambos os métodos. Observa-se que o teste UCP-LF CAA ainda não detectou os 02 indivíduos que haviam sido detectados pelo Kato-Katz, mas encontrou 44 indivíduos positivos adicionais, que não haviam sido detectados no método do Kato – Katz. Além disso, 06 indivíduos mostraram-se com resultado irresoluto no ensaio UCP-LF CAA (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação entre os métodos UCP-LF CAA e Kato-Katz na detecção da esquistossomose mansoni (n= 128) – Bananeiras, Capistrano - CE

		Total	Kato-Katz	
			Positivo	Negativo
UCP-LF Positivo	CAA	44	0	44
UCP-LF Irresoluto	CAA	6	0	6
UCP-LF Negativo	CAA	78	2	76
Total testado		128	2	126

4.5.2 UCP-LF CAA x POC-CCA

Da avaliação através dos métodos POC-CCA e UCP-LF CAA, 47 foram positivos, sendo 08 positivos no POC-CCA e 44 no UCP-LF CAA, com 05 indivíduos positivos em ambos os métodos. Observa-se que o teste UCP-LF CAA ainda não detectou os 03 indivíduos que haviam sido detectados pelo POC-CCA, mas encontrou 39 indivíduos positivos adicionais, que não haviam sido detectados no método do POC-CCA. Ressalta-se que 06 indivíduos mostraram-se com resultado irresoluto no ensaio UCP-LF CAA e 16 com resultado traço no POC-CCA (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre os métodos UCP-LF CAA e POC-CCA na detecção da esquistossomose mansoni (n= 128) – Bananeiras, Capistrano - CE

	Total	POC-CCA		
		Positivo	Traço	Negativo
CAA Positivo	44	5	8	31
CAA Irresoluto	6	0	0	6
CAA Negativo	78	3	8	67
Total testado	128	8	16	104

4.6 Sensibilidades determinadas segundo os diferentes métodos

Nesse estudo a sensibilidade dos testes foi usada para indicação de desempenho. Dessa forma, foi aplicado um padrão ("ouro") de positividade de infecção combinado, definido como sendo positivo se o indivíduo apresentou ovos de *S. mansoni* e / ou foi positivo no ensaio UCP-LF CAA e / ou foi positivo no POC-CCA (assumindo, por definição, 100% de especificidade para todos os testes), resultando em 48 indivíduos incluídos nesse grupo considerado como de ‘verdadeiros positivos’.

A análise de três lâminas de Kato-Katz de cada amostra de fezes foi capaz de detectar 4% dos indivíduos positivos. A sensibilidade do UCP-LF CAA foi de 92% (incluindo os indivíduos irresolutos como positivos, a sensibilidade permaneceu inalterada). A sensibilidade do POC-CCA foi de 17% (incluindo os indivíduos traços como positivos, a sensibilidade foi de 33%), e a sensibilidade do combinado de POC-CCA e / ou UCP-LF CAA foi de 98% (incluindo irresolutos e traços como positivos, a sensibilidade permaneceu inalterada) (Tabela 6).

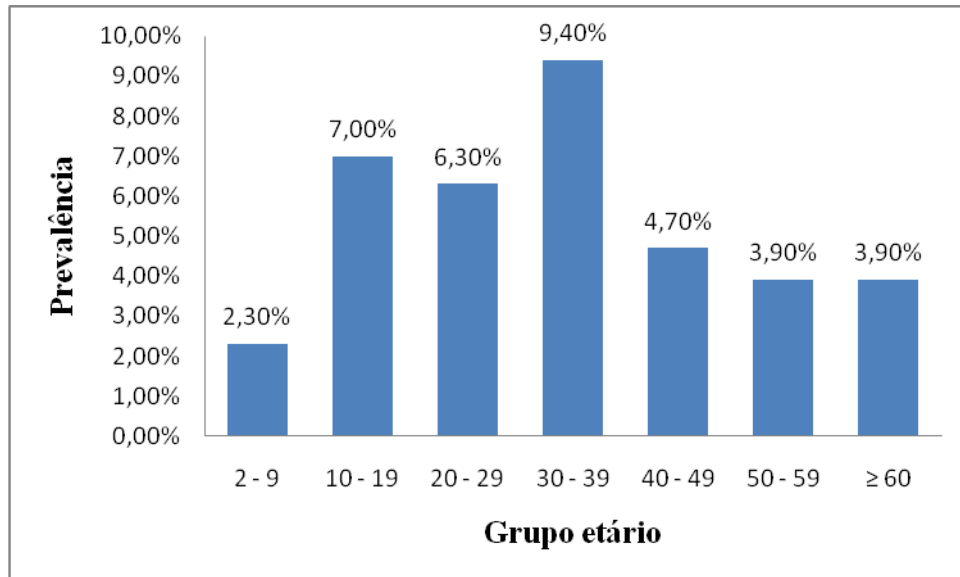
Tabela 6 – Sensibilidade do método Kato-Katz (3 lâminas) e dos ensaios de CCA e CAA na urina contra um padrão de positividade de infecção por detecção de ovos nas fezes e/ou CAA e/ou CCA em amostras de urina (assumindo 100% de especificidade para todos os testes; n= 48 positivos)

	Nº pos.	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Nº pos.	Sensibilidade (%) (IC 95%)
	Traço e Irresoluto neg.		Traço e Irresoluto pos.	
Kato-Katz (3 lâminas)	2	4 (01-14%)	2	4 (01-14%)
POC-CCA	8	17 (09-30%)	16	33 (22-47%)
UCP-LF CAA	44	92 (80-97%)	44	92 (80-97%)
CCA e/ou CAA ^a	47	98 (89-100%)	47	98 (89-100%)

^a Considerou-se ‘positivo’ os positivos no POC-CCA ou no UCP-LF CAA, ‘traço/irresoluto’ se ambos ou um dentre os dois testes foi considerado traço/irresoluto, e ‘negativo’ os negativos em ambos os testes. IC: Intervalo de confiança.

Os dados desse grupo de ‘verdadeiros positivos’ também foram analisados por grupos etários (2-9,10-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 e ≥ 60 anos) com o objetivo de obter informações sobre em que faixa etária da população foi localizada mais indivíduos infectados (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Distribuição do grupo de indivíduos ‘verdadeiros positivos’ para *S. mansoni*, detectados, através dos métodos de Kato-Katz, UCP-LF CAA e POC-CCA, segundo a idade (n= 48) – Bananeiras, Capistrano - CE



4.7 Níveis de CAA antes e após o tratamento

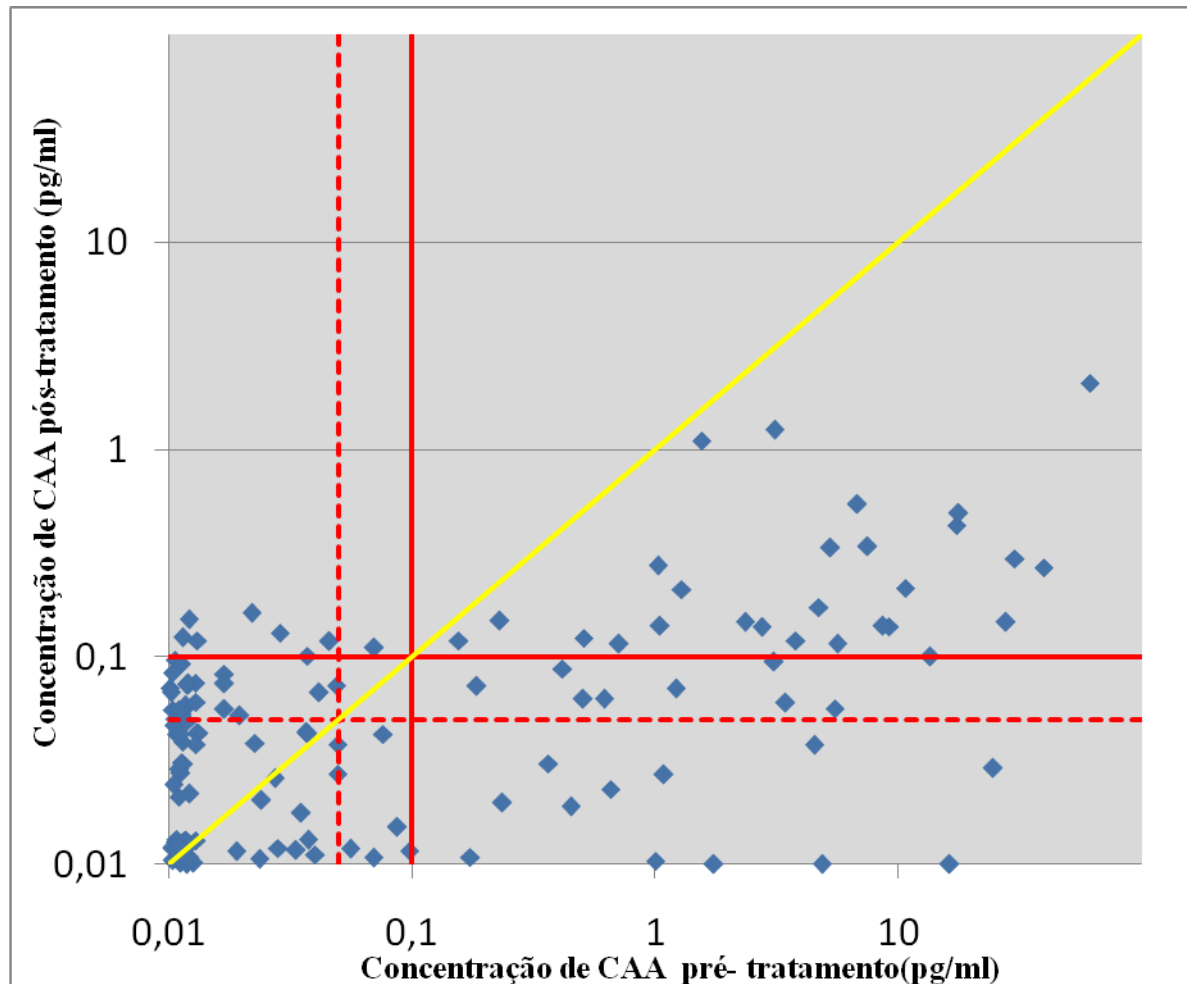
Os níveis de CAA foram determinados antes e seis semanas após a administração do praziquantel (Gráfico 4).

As concentrações de CAA dos indivíduos positivos antes do tratamento variaram de 0,16 a 61,12 pg CAA / ml de urina enquanto as dos indivíduos irresolutos variaram de 0,06 a 0,10 pg CAA / ml de urina.

Após o tratamento, as concentrações de CAA dos indivíduos positivos variaram de 0,11 a 2,10 pg CAA / ml de urina enquanto as dos indivíduos irresolutos variaram de 0,05 a 0,10 pg CAA / ml de urina.

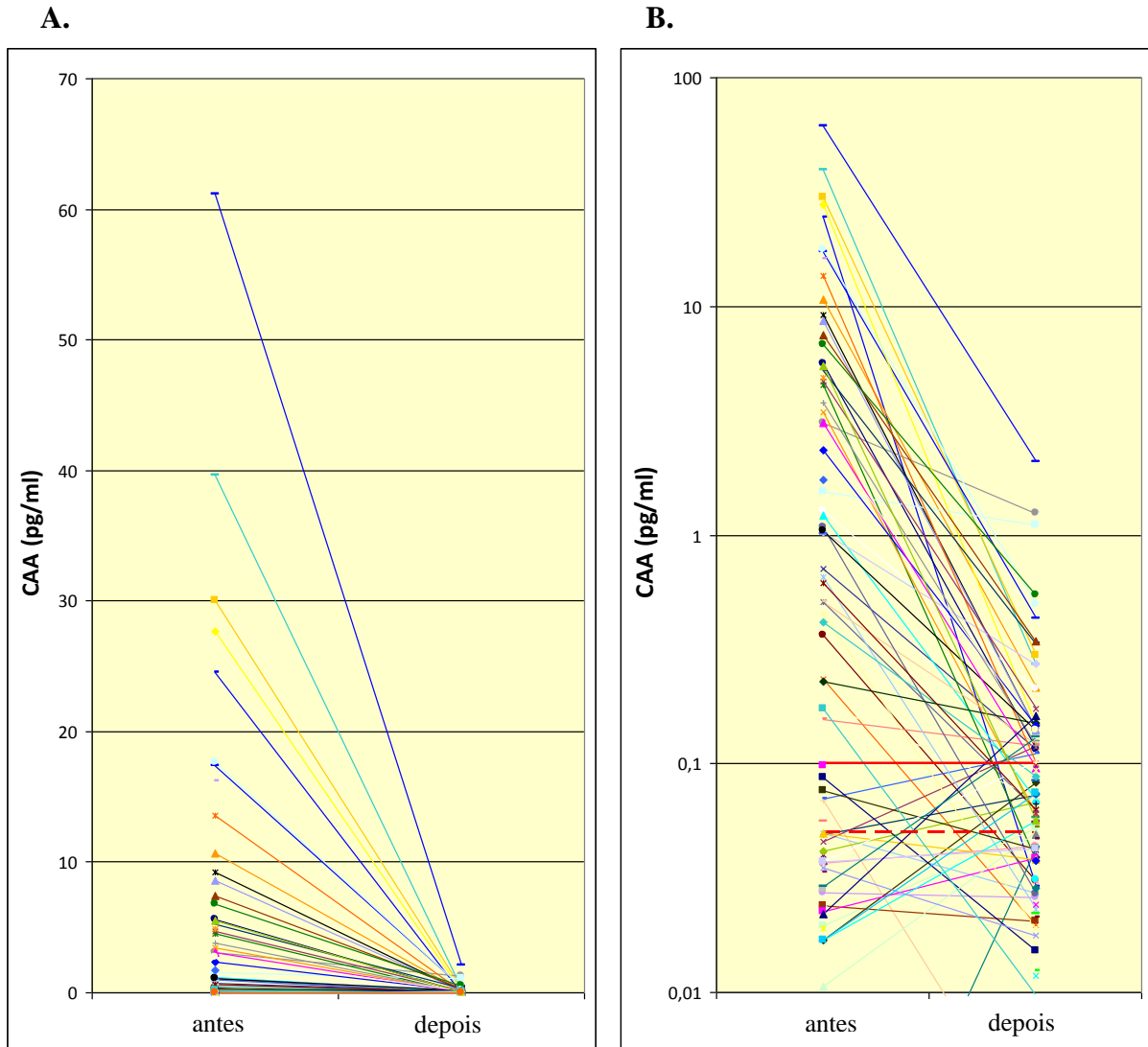
A análise pelo Wilcoxon mostrou redução significativa das concentrações de CAA após o tratamento (P=0,003) (Gráfico 5).

Gráfico 4 – Gráfico de dispersão dos valores de concentração de CAA antes e após o tratamento (n= 128)



As linhas sólidas e tracejadas vermelhas indicam os cut-off do ensaio UCP-LF de 0,1 e 0,05 pg / ml de urina, respectivamente (UCAA2000 com reagentes ‘molhados’, segundo Corstjens *et al.* (2014a)). A linha sólida amarela indica a posição ‘nenhuma mudança na concentração de CAA’; amostras com valores abaixo desta linha indicam uma diminuição da concentração de CAA 6 semanas após o tratamento.

Gráfico 5 – Decréscimo dos níveis de CAA, mostrando os respectivos valores ‘antes’ e seis semanas ‘após’ o tratamento com praziquantel (n= 128). Dados analisados pelo teste Wilcoxon (P = 0,003)



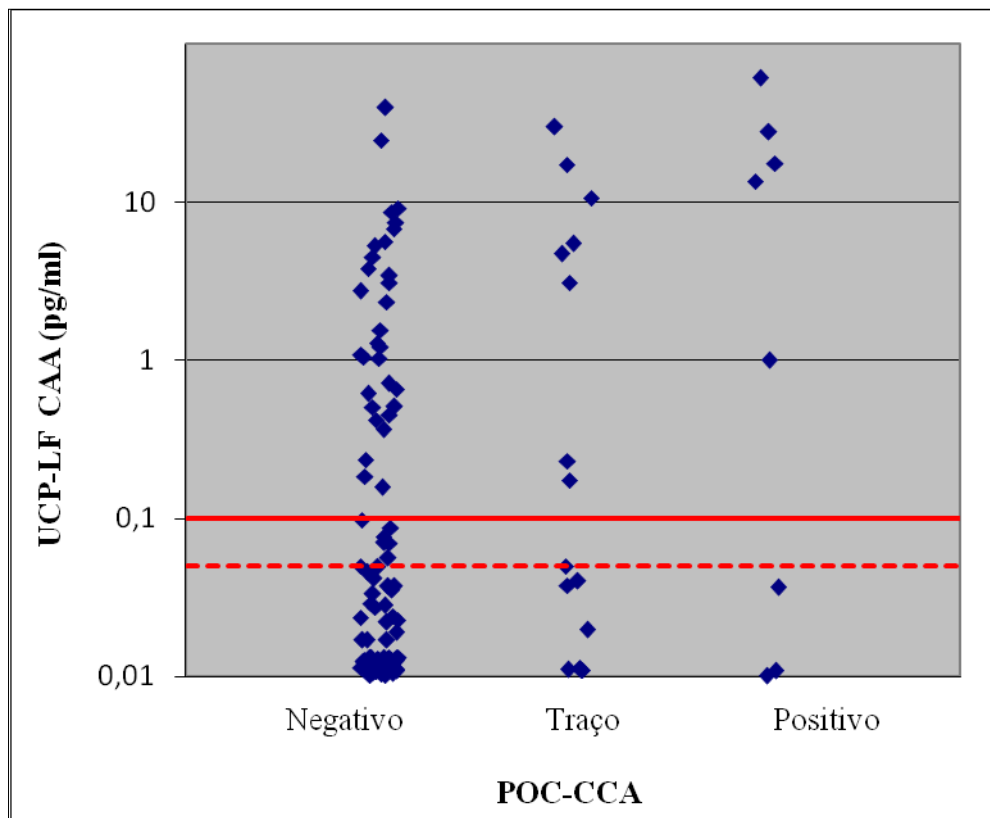
Em 'B', as linhas sólida e tracejada vermelhas indicam os cut-off do ensaio UCP-LF de 0,1 e 0,05 pg / ml de urina, respectivamente (UCAA2000 com reagentes 'molhados', segundo Corstjens *et al.* (2014a)), e o eixo Y (ordenada) encontra-se na escala logarítmica.

4.8 Correlação de UCP-LF CAA e POC-CCA

O gráfico 6 mostra a correlação entre as concentrações de CAA e as pontuações de intensidade do POC-CCA antes do tratamento (Spearman's $\rho = 0,234$; $p = 0,007$). Observou-se que oito indivíduos 'traço' no teste POC-CCA foram confirmados através do resultado positivo pelo teste UCP-LF CAA.

Como após seis semanas do tratamento todos os indivíduos foram negativos através do POC-CCA, a correlação de UCP-LF CAA com o POC-CCA após o tratamento não foi muito informativa.

Gráfico 6 – Correlação dos níveis de CAA de *S. mansoni* na urina (pg / ml) determinados pelo UCP-LF CAA com as pontuações de intensidade do POC-CCA antes do tratamento (n= 128). Dados analisados pelo teste Spearman's rho (P = 0,007)



As linhas sólida e tracejada vermelhas indicam os cut-off do ensaio UCP-LF de 0,1 e 0,05 pg / ml de urina, respectivamente (UCAA2000 com reagentes 'molhados', segundo Corstjens *et al.* (2014a)), enquanto os indivíduos na região entre a linha pontilhada e a linha sólida foram classificados como 'irresolutos'.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo destacou a potencial utilidade de amostras de urina para uma abordagem diagnóstica de infecções ativas por *S. mansoni* através da detecção de antígenos circulantes do intestino do parasita, (CCA e CAA), com ênfase para o ensaio ultra-sensível UCP-LF que detecta o Antígeno Anódico Circulante (CAA). Esse tipo de ensaio está sendo agora avaliado pela primeira vez no Brasil.

Bananeiras é historicamente um local de transmissão ativa da doença. Ao analisar os dados da Secretaria de Saúde do Ceará, por meio do Programa de Controle da Esquistossomose, que mostram a quantidade de positivos por ano trabalhado à partir de 2004, constata-se que estes não revelam a real prevalência e sim a taxa de positividade da comunidade, pois se utilizam de amostragem, como no caso do ano de 2009, quando o número de exames realizados (15 exames) foi muito pequeno para estimar a prevalência; porém se pode afirmar pelos resultados encontrados que se trata de uma região endêmica, pois sempre foram encontrados casos positivos.

Nesse estudo, a prevalência observada na localidade de Bananeiras aumentou significativamente de acordo com a abordagem de diagnóstico empregada; esta passou de 1,6% determinada pelo Kato-Katz para 34,4% pelo ensaio de urina UCP-LF CAA, representando um aumento de mais de vinte vezes. De fato, resultado semelhante, porém com um aumento inferior, foi observado em um estudo realizado na China, numa área caracterizada por uma prevalência muito baixa de *S. japonicum*, onde também foi aplicado o UCP-LF CAA utilizando 2mL de amostra de urina resultando em um aumento da prevalência de cinco vezes em relação ao Kato-Katz. Este também foi realizado pela leitura de três lâminas de uma única amostra de fezes de cada indivíduo (VAN DAM *et al.*, 2014a).

Ainda comparando o UCP-LF CAA com o método de Kato-Katz, constatou-se que o UCP-LF CAA identificou 44 casos positivos adicionais que foram negativos pelo Kato-Katz, mas por outro lado, não detectou os dois indivíduos positivos pelo Kato-Katz, corroborando com os achados do estudo de van Dam *et al.* (2014a) realizado em área de baixa prevalência, no qual o UCP-LF CAA na urina detectou 31 casos positivos adicionais ao Kato-Katz, mas não detectou 01 caso positivo pelo Kato-Katz. Da mesma forma outro estudo semelhante, porém em área de alta prevalência, mostrou que o UCP-LF CAA na urina detectou 06 casos positivos adicionais ao Kato-Katz, mas não detectou 20 casos positivos pelo Kato-Katz (VAN DAM *et al.*, 2014b). O ensaio UCP-LF CAA ainda não tem sido amplamente avaliado em áreas endêmicas, mas, com base nos resultados do anterior (menos

sensível) CAA-ELISA, mais casos positivos eram consideravelmente esperados (VAN LIESHOUT *et al.*, 1995a).

Nesse estudo, a prevalência da esquistossomose, segundo a examinação de apenas uma única lâmina pelo método de Kato-Katz conforme é recomendado pela Organização Mundial de Saúde, foi de 0,78%, conduta esta que resultaria uma subestimação da prevalência ‘verdadeira’ da doença nessa área, fato que já é amplamente reconhecido na literatura em áreas de baixa intensidade de infecção (DE VLAS; GRYSEELS, 1992; YU *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2008b; DA FROTA *et al.*, 2011).

Diversos estudos já demonstraram que a estratégia do aumento do número de amostras e também do aumento do número de lâminas examinadas por amostra podem elevar a sensibilidade dessa técnica, o que é particularmente importante em áreas de baixa transmissão (RABELLO *et al.*, 2008; DA FROTA *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012). A prevalência passou de 0,78% determinada pela leitura de uma única lâmina de Kato-Katz para 1,6% pela leitura de três lâminas, possibilitando o diagnóstico de mais um indivíduo, resultando no dobro da prevalência pelo aumento do número de lâminas analisadas nesse estudo; ressalta-se, porém, o baixo número de indivíduos diagnosticados por esse método.

Ao avaliarmos a carga parasitária dos indivíduos diagnosticados pelo Kato-Katz, calculada através da média aritmética das três lâminas analisadas, obtivemos uma intensidade de infecção de 8 ovos por grama de fezes (OPG), valor igual ao identificado por Pinheiro *et al.* (2012), que encontraram a mesma intensidade de infecção na localidade Planalto do Cajueiro, município de Maranguape, no Estado do Ceará.

Estudos baseados na detecção de CAA e CCA por metodologia de ELISA (POLMAN *et al.*, 1995; VAN LIESHOUT *et al.*, 1995a, 1995b; VAN LIESHOUT; POLDERMAN; DEELDER, 2000) demonstraram que os níveis séricos desses antígenos estão relacionados com a carga parasitária e intensidade de infecção e, mais recentemente, foi demonstrada a associação positiva dos níveis de CAA detectados pelo ensaio UCP-LF com a contagem de ovos e de vermes (CORSTJENS *et al.*, 2014a). Apesar de não ter sido possível verificar esse fato nesse estudo, visto que somente dois indivíduos foram diagnosticados pelo Kato-Katz, como no presente estudo as concentrações de CAA foram baixas, variando de 0,16 a 61,12 pg CAA / ml de urina, podemos inferir baseado nos estudos mencionados, que os indivíduos infectados detectados pelo UCP-LF possuíam uma baixa carga parasitária.

No presente estudo verificou-se que 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, o método de

Kato-Katz apresentou apenas 4% de sensibilidade contra a alta sensibilidade de 92% do ensaio UCP-LF CAA para o diagnóstico de *S. mansoni*, proporcionando assim mais evidência para a concepção cada vez mais já evidente de que a técnica de Kato-Katz amplamente utilizada para o diagnóstico de helmintos, incluindo *S. japonicum* e *S. mansoni*, é insensível em áreas de baixa endemicidade (KNOPP *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2008b; SIQUEIRA *et al.*, 2011; UTZINGER *et al.*, 2011). Essa questão é particularmente pertinente no que diz respeito à detecção de infecções por *Schistosoma* em crianças de idade pré-escolar (COULIBALY *et al.*, 2013b; STOTHARD *et al.*, 2011a; VERANI *et al.*, 2011) e em áreas já bem controladas levando a uma subestimação considerável da situação real (ZHOU *et al.*, 2011b). Com diagnósticos mais sensíveis, melhores decisões estratégicas serão feitas (COLLINS; XU; TANG, 2012).

Fatores limitantes da técnica de Kato-Katz foram descritos por diversos autores. Não se pode realizar o teste com amostras diarreicas, apesar de ser este um quadro comum na esquistossomose mansoni, principalmente na forma intestinal; possui baixa reprodutibilidade em diferentes lâminas do mesmo indivíduo e leituras desiguais são obtidas por examinadores diferentes (BERHE *et al.*, 2004; GENTILE *et al.*, 2011; KONGS *et al.*, 2001). Outra limitação é a necessidade de diferentes amostras do mesmo paciente para que se obtenha um resultado mais sensível, através da análise de múltiplas lâminas e em estudos epidemiológicos, exames repetidos se tornam pouco práticos e economicamente inviáveis. E, ainda, em áreas de baixa prevalência, menor que 10%, ou no diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária, se faz necessário o uso de metodologias complementares para que o nível de sensibilidade desse diagnóstico seja significativamente aumentado, ficando próximo da prevalência real (ENGELS; SINZINKAYO; GRYSEELS, 1996; ENK *et al.*, 2008; KONGS *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Nesse estudo, os pontos de corte do ensaio UCP-LF CAA foram escolhidos de acordo com o protocolo delineado por Corstjens *et al.* (2014a) seguindo as abordagens dos estudos de van Dam *et al.* (2014a, 2014b). Sempre há um pouco de incerteza em ensaios quantitativos em torno do cut-off; Em configurações endêmicas de baixa prevalência e/ou de baixa carga parasitária que estão caminhando para a eliminação a especificidade é muito importante. Dessa maneira, os estudos com o ensaio UCP-LF CAA têm indicado a aplicação de dois valores de cut-off, permitindo uma análise com menor e maior especificidade, dependendo da hipótese ou da finalidade do estudo, o que implicou a definição de um grupo denominado de ‘potencialmente positivos’ em estudos iniciais (CORSTJENS *et al.*, 2008b;

VAN DAM *et al.*, 2013) e, mais recentemente, chamado de ‘irresolutos’ (CORSTJENS *et al.*, 2014a.; VAN DAM *et al.*, 2014a, 2014b).

A especificidade clínica do ensaio é 100%, baseada em conjuntos de controles negativos tanto de países endêmicos como não endêmicos. Em contraste com o cut-off de alta especificidade, o de baixa especificidade pode não conduzir a 100% de especificidade clínica, ficando entre 95-98%, valendo-se ressaltar que esse parâmetro é dependente da configuração epidemiológica (CORSTJENS *et al.*, 2014a).

Os três principais argumentos para a alta especificidade do ensaio UCP-LF CAA utilizado nesse estudo são: primeiro, a singularidade do antígeno (BERGWERFF *et al.*, 1994), isto é, as cadeias de carboidratos pertencentes ao CAA possuem uma estrutura completamente única de polissacarídeo, e nenhum equivalente biológico até o momento foi descrito (VAN DAM *et al.*, 2013); segundo, a detecção por anticorpos monoclonais altamente sensíveis e específicos (seleção cuidadosa de hibridoma para melhor desempenho) (DEELDER *et al.*, 1989); e terceiro, a extração de CAA por um pré - tratamento da amostra com ácido tricloacético (TCA) (CORSTJENS *et al.*, 2014a).

Além disso, Polman *et al.* (2000) relataram alta sensibilidade e uma especificidade quase perfeita para o CAA, independentemente da população-alvo e do método de pré-tratamento, apoiando o achado descrito por Bergwerff *et al.* (1994). No entanto, houve uma especificidade inferior com CCA explicado pela reação cruzada com um epítipo comum com granulócitos que requerem maiores níveis de corte (VAN DAM *et al.*, 1996b).

A extração com TCA é o pré-tratamento de escolha, uma vez que não só parece ter influência na especificidade, mas também dissocia efetivamente os potenciais imunocomplexos (DE JONGE *et al.*, 1987), aumentando assim a sensibilidade, pelo menos teoricamente (CORSTJENS *et al.*, 2014a).

Em adição, amostras de indivíduos infectados por *Paragonimus westermanii* e *Fasciola hepatica* foram testadas com o ensaio UCP-LF CAA (SCAA500), obtendo-se resultado negativo em todas (VAN DAM, G. J., observações não publicadas).

A introdução da tecnologia das nanopartículas fosforescentes ultra-sensíveis (UCPs) foi um fator importante para o aumento da sensibilidade (CORSTJENS *et al.*, 2005). As partículas fosforescentes $Y_2O_3:S: Yb^{3+}, Er^{3+}$ de 400 nm aplicadas nesse ensaio, em comparação com outros marcadores fluorescentes convencionalmente aplicados, incluem vantagens como a elevada sensibilidade (não apresentam auto-fluorescência de outros materiais biológicos), longa vida de prateleira, registro permanente (não desbotamento), e os baixos custos (ZIJMANS *et al.*, 1999).

Além disso, a adição de um passo de concentração das amostras de urina permitindo a utilização de um volume maior de urina (2mL) pelo ensaio UCP-LF implicou um aumento da sua sensibilidade analítica, conforme indicado em estudos de laboratório por Corstjens *et al.* (2014a).

A rápida depuração após o tratamento eficaz (DE JONGE *et al.*, 1989; VAN LIESHOUT *et al.*, 1991), e aumento dos níveis de CAA ao longo de um infecção experimental (VAN DAM *et al.*, 1996a) fornece um apoio adicional para os argumentos apresentados aqui. Em adição, o uso de conjuntos de amostras de controle negativo, bem como a aplicação de um ponto de corte de alta especificidade comprovou a especificidade muito alta do ensaio UCP-LF CAA (CORSTJENS *et al.*, 2014; VAN DAM *et al.*, 2013).

O teste comercialmente disponível POC-CCA poderia potencialmente substituir o teste de Kato-Katz em relação à rápida identificação de áreas de risco para *S. mansoni* (BERGQUIST, 2013). Benefícios incluem uma economia substancial no tempo de coleta e processamento de amostras de urina (em vez de fezes), bem como economia direta em termos de custos de testes e entrega do tratamento (COLLEY *et al.*, 2013; KNOPP *et al.*, 2013).

Nesse estudo, a análise pelo POC-CCA suscitou numa prevalência de 6,25%, mostrando-se com sensibilidade superior ao Kato-Katz (17%, e, incluindo os indivíduos traços como positivos, 33%, versus 4%) e útil como uma alternativa ou complemento à essa técnica para o diagnóstico de *S. mansoni*, o que corrobora com os resultados de vários estudos que avaliaram a sua aplicabilidade no campo para o diagnóstico da esquistossomose mansoni (COLLEY *et al.*, 2013; COULIBALY *et al.*, 2013b; ERKO *et al.*, 2013; ADRIKO *et al.*, 2014; LAMBERTON *et al.*, 2014). Além disso, o POC-CCA também se mostrou útil em relação ao método parasitológico em contextos de grande endemia nas Filipinas para *S. japonicum* e no Camboja para *S. mekongi* (VAN DAM *et al.*, 2014b).

Por outro lado, quando comparado ao UCP-LF CAA, o POC-CCA não apresentou sensibilidade tão elevada (17%, e, incluindo os indivíduos traços como positivos, 33% versus 92%). Embora tenha detectado 03 indivíduos que haviam sido negativos pelo UCP-LF CAA, 39 indivíduos detectados pelo UCP-LF CAA deixaram de ser diagnosticados pelo POC-CCA.

Devido à leitura visual, o POC-CCA sofre com o comum aparecimento de sinais de 'traço', ou seja, linhas muito claras. Portanto, em uma análise de desempenho completa, os resultados geralmente são analisados com ambas as interpretações dos 'traços'. O mesmo pode ser aplicado para o intervalo 'irresoluto', conforme definido para o ensaio UCP-LF CAA (COULIBALY *et al.*, 2013b; VAN DAM *et al.*, 2014b).

Quando considerada a abordagem de diagnóstico por ambos os antígenos, a sensibilidade combinada foi de 98%. Igual estratégia foi analisada por van Dam *et al.* (2014b) indicando também um aumento da sensibilidade diagnóstica quando considerado a detecção de CAA e/ou CCA. Ressalta-se que nesse estudo o elevado percentual de sensibilidade combinada foi atribuído principalmente à detecção de CAA.

Outra abordagem diagnóstica interessante é a associação da detecção de CAA na urina e/ou no soro, que resultou uma sensibilidade de 100% na detecção de *S. japonicum* numa área de baixa prevalência na China através do ensaio UCP-LF CAA (VAN DAM *et al.*, 2014a).

A categorização da positividade por idade demonstrou que a maior taxa de prevalência de infecções ativas encontrada foi em pessoas com idades de 30 a 39 anos. Esse achado corroborou com os de van Dam *et al.* (2014a) que encontrou as maiores taxas de prevalência de infecções ativas (detectadas pelo ensaio UCP-LF CAA) também em pessoas mais velhas (com idades com 40 anos e acima). Isso é uma observação importante do ponto de vista estratégico para tomada de decisões dos Programas de Controle, visto que como a abordagem de controle para áreas com níveis de prevalência entre 10% e 50% visa preferencialmente o tratamento apenas dos escolares (WHO, 2002, 2006), muitos desses indivíduos positivos permaneceriam sem tratamento e continuariam a contribuir para a transmissão da doença.

Quanto às análises pelos antígenos circulantes após o tratamento específico, verificou-se que enquanto todos os indivíduos foram negativos segundo o POC-CCA, 35 (27,5%) indivíduos foram positivos para *S. mansoni* conforme o UCP-LF CAA. Essa diferença pode ser atribuída provavelmente à ultra-sensibilidade que é alcançada por esse ensaio pelas razões expostas e discutidas anteriormente especialmente atreladas ao sistema de detecção das nanopartículas fosforescentes ultra-sensíveis (UCPs), à etapa de concentração das amostras e consequente utilização de um volume maior no ensaio, e ao pré-tratamento das amostras com TCA.

Essa elevada sensibilidade analítica possibilita a detecção do antígeno mesmo em quantidades ínfimas, com níveis de detecção já demonstrados como bem inferiores a 1 pg / ml (CORSTJENS *et al.*, 2014a). É esperado que a concentração de 1 pg / ml no soro permita a identificação de infecções por um único verme, uma vez que estudos de cultura de vermes *in vitro* e estudos com babuínos infectados experimentalmente indicam níveis de CAA de aproximadamente 5 pg / mL no soro num estado estacionário (VAN DAM *et al.*, 1996a; WILSON *et al.*, 2006).

Ainda acerca dessa persistência considerável de indivíduos infectados após o tratamento detectados pelo UCP-LF CAA, seria muito interessante estudar isso ainda mais com um bom protocolo, mas pelo menos quatro pontos precisam ser discutidos.

Primeiro, seis semanas deve ser suficiente para a depuração do antígeno (DE JONGE *et al.*, 1989; VAN LIESHOUT *et al.*, 1991), especialmente nessas concentrações bastante baixas, de modo que a presença de CAA na urina ainda é indicativo da presença de vermes remanescentes, embora numa carga muito baixa.

Segundo, um recente estudo demonstrou que as taxas de cura contra o *S. mansoni*, determinadas um mês após o tratamento, variaram de 52-92% (DANSO-APPIAH *et al.*, 2013). Em acréscimo, uma recente revisão sistemática da literatura revelou uma taxa de cura global de 71,3% do praziquantel contra *S. haematobium* e *S. mansoni* (STOTHARD *et al.*, 2013b). Assim, esses estudos, entre outros baseados tanto na detecção de antígenos circulantes quanto por PCR (VINKELES MELCHERS *et al.*, 2014), já demonstraram que a efetividade do praziquantel é reconhecida como aquém de 100% de modo que possivelmente nem todos os vermes foram mortos, além de que se sabe também que os vermes podem se recuperar a partir do ataque do PZQ (CORSTJENS *et al.*, 2014a).

Terceiro, embora o mecanismo de ação do PZQ não seja completamente compreendido, sabe-se que a morte dos vermes é dependente de uma resposta imune ativa, por isso, em pessoas com alguma imunodepressão os vermes podem sobreviver relativamente fácil (SABAH *et al.*, 1985; BRINDLEY; SHER, 1987; DOENHOFF *et al.*, 2008).

Finalmente, quando há vermes adultos, e a transmissão está acontecendo, haverá também vermes jovens, que não são afetados por PZQ (SABAH *et al.*, 1986). Eles irão crescer tornando-se vermes adultos durante um período de semanas e irão começar a excretar níveis mais elevados de CAA.

Vale-se ressaltar ainda que dentre os 35 (27,5%) indivíduos que foram positivos para *S. mansoni* pelo UCP-LF CAA após o tratamento, 27 eram também positivos antes do tratamento, mas haviam 7 negativos e 1 irresoluto. Além disso, a maioria dos indivíduos considerados irresolutos seis semanas após o tratamento (n=22), eram negativos antes da administração do praziquantel, portanto, esses indivíduos seriam provavelmente negativos. Dessa forma, é necessário fazer uma investigação minuciosa acerca dessas análises pós-tratamento em estudos posteriores, sendo preciso também avaliar a definição do cut-off do ensaio UCP-LF CAA, que sempre é um alvo de debate.

Apesar do número considerável de indivíduos positivos após o tratamento pelo UCP-LF CAA, verificou-se que as concentrações de CAA nesses indivíduos foram bastante

baixas. A análise pelo Wilcoxon mostrou redução significativa das concentrações de CAA seis semanas após o tratamento ($P=0,003$), o que está de acordo com os achados de Corstjens *et al.* (2014a) que mostraram o decréscimo nas concentrações de CAA na urina dois meses após a administração do praziquantel em indivíduos infectados por *S. haematobium* e indicaram que a determinação dos níveis de CAA imediatamente antes e logo após a administração da droga pode ser um melhor indicador para monitoramento da eficiência das drogas, e que a análise do efeito da administração de drogas pela quantificação dos níveis de CAA em vez da monitorização da produção de ovos podem fornecer resultados mais precisos.

A correlação entre as concentrações de CAA e as pontuações de intensidade do POC-CCA antes do tratamento (Spearman's $\rho = 0,234$; $p = 0,007$), embora significativa não foi considerada muito elevada. Todavia, no estudo que avaliou essa mesma correlação, porém em indivíduos infectados por *S. mekongi*, uma correlação maior e mais significativa (Spearman's $\rho = 0,60$; $p < 0,001$) foi encontrada (VAN DAM *et al.*, 2014b). Além disso, vale-se ressaltar que oito indivíduos 'traço' no teste POC-CCA foram confirmados através do resultado positivo pelo teste UCP-LF CAA. Já a correlação de UCP-LF CAA com o POC-CCA após o tratamento não foi muito informativa, visto que após seis semanas do tratamento todos os indivíduos foram negativos através do POC-CCA.

Um teste de diagnóstico rápido e de baixo custo capaz de detectar poucos vermes de *Schistosoma* é urgentemente necessário quando se caminha para a fase de eliminação da esquistossomose (KNOPP *et al.*, 2013). Há diferenças significativas entre os métodos tradicionais de diagnóstico, tais como microscopia de fezes e sorologia, e o diagnóstico por PCR e pela detecção de antígenos circulantes. Enquanto a sorologia é uma técnica indireta, as outras abordagens são diretas e, por conseguinte, aplicáveis, dependendo da sensibilidade, para indicar o estado de infecção ou o tratamento. A PCR pode ser vista como uma melhoria na abordagem através do exame das fezes, visto que tem como alvo produtos dos vermes excretados pela via fecal, enquanto os antígenos circulantes são detectados no soro ou na urina. Do ponto de vista operacional, a coleta de urina é uma opção preferível, já que é menos constrangedora e invasiva do que a coleta das amostras de fezes e/ou de sangue, respectivamente.

Uma explicação para as inconsistências entre estes testes de diagnóstico relaciona-se com a atual falta de um teste padrão de referência definitivo para detectar todas as infecções de *Schistosoma* em situações da vida real (VAN DAM *et al.*, 2014a).

A decisão política em diferentes fases do controle da esquistossomose é bastante variável (de morbidade para o controle de infecção, controle de transmissão, interrupção de

transmissão, e, finalmente, a eliminação) (BERGQUIST; JOHANSEN; UTZINGER, 2009). A introdução e o amplo uso da técnica de Kato-Katz padronizaram a situação para áreas de alta endemicidade, mas à medida que avançamos para o outro extremo em grandes partes do mundo endêmico, um padrão mais sensível é necessário (UTZINGER *et al.*, 2011).

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

- A técnica de Kato-Katz com a análise de três lâminas de uma única amostra fecal apresentou baixa sensibilidade, implicando uma subestimação da prevalência da esquistossomose mansoni na localidade;
- O ensaio UCP-LF CAA mostrou uma maior sensibilidade, detectando uma significante maior prevalência de infecções ativas por *Schistosoma mansoni* em comparação ao Kato-Katz e ao POC-CCA;
- O teste POC-CCA apresentou sensibilidade superior ao método parasitológico de Kato-Katz e inferior ao UCP-LF CAA;
- O aparecimento de sinais de ‘traço’ (POC-CCA) e irresoluto (UCP-LF CAA) gera um grau de incerteza;
- A categorização da positividade, em pelo menos um dos métodos diagnósticos, por idade, demonstrou que a maior taxa de prevalência de infecções ativas encontrada foi em pessoas com idades de 30 a 39 anos;
- Após seis semanas do tratamento houve um decréscimo significativo dos níveis de CAA;
- O número considerável de indivíduos CAA-positivos após a administração do Praziquantel pode estar relacionado com uma possível falha terapêutica;
- A correlação entre as concentrações de CAA e as pontuações de intensidade do POC-CCA antes do tratamento, embora significativa não foi considerada muito elevada.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio UCP-LF CAA como um método ultra-sensível foi empregado pela primeira vez no Brasil para amostras de urina de indivíduos infectados por *S. mansoni* provenientes de uma área de baixa carga parasitária, mostrando-se como uma abordagem diagnóstica com valor potencial.

Tendo em conta essas observações promissoras, um estudo maior deve ser realizado com o objetivo de fornecer mais evidências sobre o potencial para o ensaio UCP-LF CAA contra a abordagem atual de diagnóstico parasitológico utilizada em áreas endêmicas para *S. mansoni*. Um maior número de amostras analisadas possibilitaria aumentar a precisão das sensibilidades medidas, especialmente em área de baixa endemicidade. Uma abordagem mais consistente para a definição do grupo de ‘verdadeiros positivos’ teria de ser definido, como, por exemplo, a busca exaustiva através dos exames parasitológicos ou mesmo a utilização de uma técnica altamente sensível e específica como a PCR, já que é notória a não aplicabilidade do convencional Kato-Katz (uma lâmina) como teste de referência para avaliação de novos testes de diagnóstico em áreas de baixa endemicidade.

Apesar dessas incertezas, é valioso sabermos que o diagnóstico da esquistossomose por antígenos circulantes, aponta como uma ferramenta promissora na busca de indivíduos não diagnosticados pelos métodos convencionais, principalmente em áreas de baixa endemicidade.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEZ, S.K.; PHILLIPS, S.M.; ZODDA, D.M. *Schistosoma mansoni*: detection and characterization of antigens and antigenemia by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Exp. Parasitol.**, v. 55, n. 2, p. 219-232, 1983.
- ADRIKO, M.; STANDLEY, C. J.; TINKITINA, B.; TUKAHEBWA, E. M.; FENWICK, A.; FLEMING, F. M.; SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; STOTHARD, J. R.; KABATEREINE, N. B. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. **Acta Trop.**, v. 136, p. 50-57, 2014.
- AGNEW, A.M.; FULFORD, A.J.C.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F.W.; RODRIGUEZ-CHACON, M.; GUTSMANN, V.; DEELDER, A.M. The relationship between worm burden and levels of a circulating antigen (CAA) of five species of *Schistosoma* in mice. **Parasitol. Int.**, v. 111, p. 67-76, 1995.
- AHMAD, G.; ZHANG, W.; TORBEN, W.; AHROROV, A.; DAMIAN, R.T.; WOLF, R.F.; WHITE, G.L.; CAREY, D.W.; MWINZI, P.N.; GANLEY-LEAL, L.; KENNEDY, R.C.; SIDDIQUI, A.A. Preclinical prophylactic efficacy testing of Sm-p80-based vaccine in a nonhuman primate model of *Schistosoma mansoni* infection and immunoglobulin G and E responses to Sm-p80 in human serum samples from an area where schistosomiasis is endemic. **J. Infect. Dis.**, v. 204, n. 9, p. 1437-1449, 2011.
- ALARCÓN DE NOYA, B.; RUIZ, R.; LOSADA, S.; COLMENARES, C.; CONTRERAS, R.; CESARI, I.M.; NOYA, O. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. **Acta Trop.**, v. 103, n. 1, p. 41-49, 2007.
- ALMEIDA, Y.M. Esquistossomose mansônica no Ceará: notas bibliográficas, 1920 a 1977. **Rev. Med. UFC**, v. 39, n. 1-2, p. 18-20, 1999. Disponível em: <<http://www.revistademedicina.ufc.br/v39/v393.htm>>. Acessado em: 20 abr. 2012.
- ANDRADE, Z.A. A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 509-513, 2002.
- ANDRADE, Z. A.; DE QUEIROZ, A. C. Renal lesions in hepatosplenic schistosomiasis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 10, p. 36-40, 1968.
- ANDRADE, Z.A.; SADIGURSKY, M. Immunofluorescence studies of schistosome structures which share determinants with circulating schistosome antigens. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 316-317, 1978.
- AYELE, B.; ERKO, B.; LEGESSE, M.; HAILU, A.; MEDHIN, G. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) strip for diagnosis of urinary schistosomiasis in Hassoba school children, Afar, Ethiopia. **Parasite**, v. 15, n. 1, p. 69-75, 2008.
- BALEN, J.; ZHAO, Z.Y.; WILLIAMS, G.M.; MCMANUS, D.P.; RASO, G.; UTZINGER, J.; ZHOU, J.; LI, Y.S. Prevalence, intensity and associated morbidity of *Schistosoma*

japonicum infection in the Dongting Lake region, China. **Bull. World Health Organ.**, v. 85, n. 7, p. 519-526, 2007.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B. Epidemiologia da esquistossomose mansônica no Engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 8, n. 1, p. 83-87, 1992.

BARBOSA, F.S.; GONÇALVES, I.F.; MELOM M.C.V. Formas Hepatoesplênicas da Esquistossomose Mansônica no Interior do Nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 11, n. 2, p. 325-331, 1995.

BARSOUM, R. S. Schistosomal glomerulopathies. **Kidney Int.**, v. 44, p. 1-12, 1993.

BERGGREN, W.L.; WELLER, T.H. Immuno-electrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 16, p. 606-612, 1967.

BERGQUIST, R. Good things are worth waiting for. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 3, p. 409-410, 2013.

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.

BERGWERFF, A.A.; VAN DAM, G.J.; ROTMANS, J.P.; DEELDER, A.M.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.G. Immunologically reactive part of immunopurified circulating anodic antigen from *Schistosoma mansoni* is a threonine-linked polysaccharide consisting of -6)- [β-D-GlcA-(1-3)]-; β-D-GalpNAc-1-*repeating units. **J Biol. Chem.**, v. 269, p. 31510-31517, 1994.

BERHE, N.; MEDHIN, G.; ERKO, B.; SMITH, T.; GEDAMU, S.; BEREDED, D.; MOORE, R. Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, v. 92, n. 3, p. 205-212, 2004.

BOGITSH, B.J. Observation on digestion in schistosomes or 'blood and guts'. **Trans. Am. Microscop. Soc.**, v. 108, n. 1, p. 1-5, 1989.

BONESSO-SABADINI, P.I.P.; DIAS, L.C.S. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 381–385, 2002.

BORGES, J.J.; NIBBELING, H.A.; VAN MARCK, E.A.; DEELDER, A.M. Immunofluorescent visualization of the excretory and gut system of *Schistosoma mansoni* by confocal laser scanning microscopy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, p. 612-619, 1994.

BOSOMPEM, K.M.; BENTUM, I. A.; OTCHERE, J.; ANYAN, W. K.; BROWN, C. A.; OSADA, Y.; TAKEO, S.; KOJIMA, S.; OHTA, N. Infant schistosomiasis in Ghana: a survey in an irrigation community. **Trop. Med. Int. Health**, v. 9, p. 917–922, 2004.

BOUKLI, N.M.; DELGADO, B.; RICAURTE, M.; ESPINO, A.M. *Fasciola hepática* and *Schistosoma mansoni*: Identification of common proteins by comparative proteomic analysis. **J. Parasitol.**, v. 97, n. 5, p. 852-861, 2011.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Coordenadoria do Controle de Doenças. **Vigilância epidemiológica e controle da esquistossomose**: normas e instruções controle da esquistossomose do estado de São Paulo/PCE-SP, versão 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações Hospitalares (SIH)/ Sistema Único de Saúde**, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM)/ Sistema Único de Saúde**, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE)/ Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)**, 2014c.

BRINDLEY, P.J.; SHER, A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. **J. Immunol.**, v. 139, n. 1, p. 215-220, 1987.

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.

CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Curr. Opin.Chem. Biol.**, v. 11, p. 433-439, 2007.

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

CARLIER, Y.; BOUT, D.; BINA, J.C.; CAMUS, D.; FIGUEIREDO, J.F.M.; CAPRON, A. Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, p. 949-954, 1975.

CARLIER, Y.; BOUT, D.; CAPRON, A. Detection of *Schistosoma mansoni* M antigen in circulating immune-complexes and in kidneys of infected hamsters. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 4, p. 534-538, 1980b.

CARLIER, Y.; BOUT, D.; CAPRON, A. Further studies on the circulating M antigen in human and experimental *Schistosoma mansoni* infections. **Ann. Immunol.**, v. 129 C, p. 811-818, 1978.

CARLIER, Y.; BOUT, D.; STRECKER, G.; DEBRAY, H.; CAPRON, A. Purification, immunochemical, and biologic characterization of the *Schistosoma* circulating M antigen. **J Immunol.**, v. 124, n. 5, p. 2442-2450, 1980a.

CARNEIRO, T.R.; PINHEIRO, M.C.; DE OLIVEIRA, S.M.; HANEMANN, A.L.P.; QUEIROZ, J.A.N.; BEZERRA, F.S.M. Increased detection of schistosomiasis with Kato-Katz and SWAP-IgG-ELISA in a Northeastern Brazil low-intensity transmission area. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 4, p. 510-513, 2012.

CARNEIRO, T.R.; PINHEIRO, M.C.C.; OLIVEIRA, S.M.; PERALTA, R.H.S.; PERALTA, J.M.; BEZERRA, F. S. M. Convencional PCR for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low endemic area in Ceará state, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 13, p. 1037-1044, 2013.

CARVALHO, G.B.; SILVA-PEREIRA, R.A.; PACÍFICO, L.G.; FONSECA, C.T. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.106, n.7, p. 837-843, 2011.

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

CAVALCANTI, M.G.; GONÇALVES, M.M.; BARRETO, M.M.; SILVA, A.H.; MADI, K.; PERALTA, J.M.; IGREJA, R.P. Genital schistosomiasis mansoni concomitant to genital tumor in areas of low endemicity: challenging diagnosis. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 15, n. 2, p. 174-177, 2011.

CAVALCANTI, M. G.; SILVA, L. F.; PERALTA, R. H.; BARRETO, M. G.; PERALTA, J. M. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends Parasitol.**, v. 29, n. 2, p. 75-82, 2013.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Programa de Controle da Esquistossomose**. Fortaleza, 2014.

CESARI, I.M.; BALLEEN, D.E.; MENDOZA, L.; FERRER, A.; POINTIER, J.P.; KOMBILA, M.; RICHARD-LENOBLE, D.; THÉRON, A. Immunoblot analysis of membrane antigens of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, and *Schistosoma haematobium* against *Schistosoma*-infected patient sera. **Parasitol. Res.**, v. 106, n. 5, p. 1225-1231, 2010.

CHAND, M.A.; CHIODINI, P.L.; DOENHOFF, M.J.; Development of a new assay for the diagnosis of schistosomiasis, using cercarial antigens. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, p. 255–258, 2010.

CHU, X.; XIANG, Z.F.; FU, X.; WANG, S.P.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. Silver-enhanced colloidal gold metalloimmunoassay for *Schistosoma japonicum* antibody detection. **J. Immunol. Methods**, v. 301, n. 1-2, p. 77-88, 2005.

CHUNGE, C.N.; CHUNGE, R.N.; MASINDE, M.S.; ATINGA, J.N. An outbreak of acute schistosomiasis following a church retreat to Mwanza, Tanzania, 2008. **J. Travel Med.**, v.18, n. 6, p. 408-410, 2011.

CLERINX, J.; BOTTIEAU, E.; WICHMANN, D.; TANNICH, E.; VAN ESBROECK, M. Acute schistosomiasis in a cluster of travelers from Rwanda: diagnostic contribution of

schistosome DNA detection in serum compared to parasitology and serology. **J. Travel Med.**, v.18, n. 6, p. 367-372, 2011.

CNOPS, L.; TANNICH, E.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; VAN ESBROECK, M. Schistosoma real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants. **Trop. Med. Int. Health**, v. 17, n. 10, p. 1208-1216, 2012.

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

COLLEY, D.G.; BINDER, S.; CAMPBELL, C.; KING, C.H.; TCHUEM TCHUENTE, L.A.; N'GORAN, E.K.; ERKO, B.; KARANJA, D.M.; KABATEREINE, N.B.; VAN LIESHOUT, L.; RATHBUN, S. A five-country evaluation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen urine assay for the prevalence of Schistosomiasis mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 426-432, 2013.

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

COLLINS, C.; XU, J.; TANG, S. Schistosomiasis control and the health system in P.R. China. **Infect. Dis. Poverty**, v. 1, n. 1, p. 8, 2012.

CORSTJENS, P. L.; CHEN, Z.; ZUIDERWIJK, M.; BAU, H. H.; ABRAMS, W. R.; MALAMUD, D.; SAM; NIEDBALA, R.; TANKE, H. J. Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1098, p. 437-445, 2007.

CORSTJENS, P. L.; D. E. DOOD CJ; KORNELIS, D.; TJON KON FAT, E. M.; WILSON, R. A.; KARIUKI, T. M.; NYAKUNDI, R. K.; LOVERDE, P. T.; ABRAMS, W. R.; TANKE, H. J.; VAN LIESHOUT, L.; DEELDER, A. M.; VAN DAM, G.J. Tools for diagnosis, monitoring and screening of Schistosoma infections utilizing lateral-flow based assays and upconverting phosphor labels. **Parasitology**, v. 16, p. 1-15, 2014a.

CORSTJENS, P. L.; DE DOOD, C. J.; PRIEST, J. W.; TANKE, H. J.; HANDALI, S. Feasibility of a lateral flow test for neurocysticercosis using novel up- converting nanomaterials and a lightweight strip analyzer. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 7, p. e2944, 2014b.

CORSTJENS, P.; ZUIDERWIJK, M.; BRINK, A.; LI, S.; FEINDT, H.; NIEDBALA, R.S.; TANKE, H. Use of up-converting phosphor reporters in lateral-flow assays to detect specific nucleic acid sequences: a rapid, sensitive DNA test to identify human papillomavirus type 16 infection. **Clin. Chem.**, v. 47, p. 1885-1893, 2001.

CORSTJENS, P.L.; LI, S.; ZUIDERWIJK, M.; KARDOS, K.; ABRAMS, W.R.; NIEDBALA, R.S.; TANKE, H.J. Infrared up-converting phosphors for bioassays. **IEE Proc. Nanobiotechnol.**, v. 152, n. 2, p. 64-72, 2005.

CORSTJENS, P.L.; VAN LIESHOUT, L.; ZUIDERWIJK, M.; KORNELIS, D.; TANKE, H.J.; DEELDER, A.M.; VAN DAM, G.J. Up-converting phosphor technology-based lateral

flow assay for detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen in serum. **J.Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 171–176, 2008b.

CORSTJENS, P.L.; ZUIDERWIJK, M.; TANKE, H.J.; VAN DER PLOEG-VAN SCHIP, J.J.; OTTENHOFF, T.H.; GELUK, A. A user-friendly, highly sensitive assay to detect the IFN-gamma secretion by T cells. **Clin. Biochem.**, v. 41, n. 6, p. 440-444, 2008a.

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

COULIBALY, J. T.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; DOENHOFF, M. J.; DAWSON, E.M. A new rapid diagnostic test for detection of anti- *Schistosoma mansoni* and anti-*Schistosoma haematobium* antibodies. **Parasit. Vectors**, v. 6, p. 29, 2013a.

COULIBALY, J. T.; N'GBESSO, Y. K.; KNOPP, S.; N'GUESSAN, N. A.; SILUE, K. D.; VAN DAM, G. J.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J. Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. e2109, 2013b.

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

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.

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 Trop.**, v. 120, suppl. 1, p. S138-S141, 2011.

DANSO-APPIAH, A.; OLLIARO, P.L.; DONEGAN, S.; SINCLAIR, D.; UTZINGER, J. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. **Cochrane Database Syst Rev.**, 2:CD000528, 2013.

DAVIS, A. Antischistosomal drugs and clinical practice. In: JORDAN, P.; WEBBE, G.; STURROCK, F.S. **Human schistosomiasis**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 367–404.

DAWSON, E. M.; SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; KABATEREINE, N. B.; DOENHOFF, M. J.; STOTHARD, J. R. Intestinal schistosomiasis in pre school-aged children of Lake Albert, Uganda: diagnostic accuracy of a rapid test for detection of anti-schistosome antibodies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 107, n. 10, p. 639-647, 2013.

DE BONT, J.; VAN LIESHOUT, L.; DEELDER, A.M.; YSEBAERT, M.T.; VERCRUYSSSE, J. Circulating antigen levels in serum of cattle naturally infected with *Schistosoma mattheei*. **Parasitology**, v. 113, n. pt 5, 465–471, 1996.

DE JONGE, N.; FILLIÉ, Y.E.; DEELDER, A.M. A simple and rapid treatment (trichloroacetic acid precipitation) of serum samples to prevent non-specific reactions in the immunoassay of a proteoglycan. **J. Immunol. Methods**, v. 99, n. 2, p. 195-197, 1987.

DE JONGE, N.; FILLIÉ, Y.E.; HILBERATH, G.W.; KRIJGER, F.W.; LENGELER, C.; DE SAVIGNY, D.H.; VAN VLIET, N.G.; DEELDER, A.M. Presence of the schistosome circulating anodic antigen (CAA) in urine of patients with *Schistosoma mansoni* or *S. haematobium* infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, n. 5, p. 563-569, 1989.

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

DE JONGE, N.; RABELLO, A. L. T.; KRIJGER, F.W.; KREMSNER, P. G.; ROCHA, R. S.; KATZ, N.; DEELDER, A.M. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 756-759, 1991.

DE VLAS, S.J.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitol. Today**, v. 8, p. 274-277, 1992.

DE WATER, R.; FRANSEN, J.A.M.; DEELDER, A.M. Ultrastructural localization of the circulating cathodic antigen in the digestive tract of various life-cycle stages of *Schistosoma mansoni*. **Z. Parasitenkd.**, v. 72, n. 5, p. 635-646, 1986a.

DE WATER, R.; FRANSEN, J.A.M.; DEELDER A.M. Ultrastructural localization of the circulating anodic antigen in the digestive tract of *Schistosoma mansoni* using monoclonal antibodies in an immunogold labeling procedure. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 3, p. 549- 558, 1986b.

DEELDER, A.M.; DE JONGE, N.; BOERMAN, O.C.; FILLIE, Y.E.; HILBERATH, G.W.; ROTMANS, J.P.; GERRITSE, M.J.; SCHUT, D.W.O. Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, n. 3, p. 268-272, 1989.

DEELDER, A.M.; EL DOSOKY, I.; VAN MARCK, E.A.E.; QIAN, Z.L. Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. **Z. Parasitenkd.**, v. 71, p. 317-323, 1985.

DEELDER, A.M.; KLAPPE, T.M.; VAN DEN, A.; ARDWEG, G.J.M.J.; VAN MEERBEKE, E.H.E.M. *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. **Exp. Parasitol.**, v. 40, n. 2, p. 189-197, 1976.

DEELDER, A.M.; KORNELIS, D.; VAN MARCK, E.A.E.; EVELEIGH, P.C.; VAN EGMOND, J.G. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide

antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. **Exp. Parasitol.**, v. 50, p. 16-32, 1980.

DEELDER, A.M.; MILLER, R.L.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F.W. Detection of schistosome antigen in mummies. **Lancet**, v. 335, p. 724-725, 1990.

DEELDER, A.M.; QIAN, Z.L.; KREMSNER, P.G.; ACOSTA, L.; RABELLO, A.L.T.; ENYONG, P.; SIMARRO, P.P.; VAN ETTEN, C.M.; KRIJGER, F.W.; ROTMANS, J.P.; FILLIE, Y.E.; DE JONGE, N.; AGNEW A.M.; VAN LIESHOUT, L. Quantitative diagnosis of schistosoma infection by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Trop. Geogr. Med.**, v. 46, 4 spec. n., p. 233-238, 1994.

DEELDER, A.M.; VAN DAM, G. J.; VAN LIESHOUT, L. Response to: accuracy of circulating cathodic antigen tests for rapid mapping of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infections in Southern Sudan by RA Ashton *et al.* (2011) *Tropical Medicine & International Health* 16, pp. 1099–1103. **Trop. Med. Int. Health**, v. 17, n. 3, p. 402-403, 2012.

DEELDER, A.M.; VAN DAM, G.J.; KORNELIS D.; FILLIÉ Y.E.; VAN ZEYL, R.J.M. *Schistosoma*: analysis of monoclonal antibodies reactive with the circulating antigens CAA and CCA. **Parasitology**, v. 112, p. 21-35, 1996.

DOENHOFF, M.J.; KUSEL, J.R.; COLES, G.C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, n. 5, p. 465-469, 2002.

DOENHOFF, M.J.; WHEELER, J.G.; TRICKER, K.; HAMILTON, J.V.; STURROCK, R.F.; BUTTERWORTH, A.E.; OUMA, J.H.; *et al.*; The detection of antibodies against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens (SEA) and CEF6 in ELISA, before and after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 7, p. 697-709, 2003.

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, n. 1, p. 35-39, 2004.

DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 659-667, 2008.

DOENHOFF, M.J.; HAGAN, P.; CIOLI, D.; SOUTHGATE, V.; PICA-MATTOCCIA, L.; BOTROS, S.; COLES, G.; TCHUEM TCHUENTÉ, L.A.; MBAYE, A.; ENGELS, D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**, v.136, n. 13, p. 1825-1835, 2009.

DOWNS, J. A.; VAN DAM, G. J.; CHANGALUCHA, J. M.; CORSTJENS, P. L.; PECK, R. N.; DE DOOD, C. J.; BANG, H.; ANDREASEN, A.; KALLUVYA, S. E.; VAN LIESHOUT, L.; JOHNSON, W. D., JR.; FITZGERALD, D. W. Association of Schistosomiasis and HIV infection in Tanzania. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 5, p. 868-873, 2012.

EKPO, U. F.; AKINTUNDE, L.D.; OLUWOLE, A. S.; SAM-WOBO, S. O.; MAFIANA, C. F. Urinary schistosomiasis among preschool children in a rural community near Abeokuta, Nigeria. **Parasit. Vectors**, v. 3, p. 58, 2010.

EL DOSOKY, I.; VAN MARCK, E.A.E.; DEELDER, A.M. Presence of *Schistosoma mansoni* antigens in liver, spleen and kidney of infected mice: a sequential study. **Z. Parasitenkd.**, v. 70, p. 491-497, 1984.

ELHAG, S.M.; ABDELKAREEM, E. A.; YOUSIF, A. S.; FRAH, E. A.; MOHAMED, A. B. Detection of schistosomiasis antibodies in urine patients as a promising diagnostic maker. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 4, p. 773-777, 2011.

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, p. 319-324, 1996.

ENK, M.J.; LIMA, A.C.; DRUMMOND, S.C.; SCHALL, V.T.; COELHO, P.M. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Trop.**, v. 108 n. 2-3, p. 222-228, 2008.

ENK, M. J.; OLIVEIRA E SILVA, G.; RODRIGUES, N.B. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR System for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38947, 2012.

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

ESPÍRITO-SANTO, M. C.; ALVARADO-MORA, M. V.; PINTO, P. L.; DE BRITO, T.; BOTELHO-LIMA, L.; HEATH, A. R.; AMORIM, M. G.; DIAS-NETO, E.; CHIEFFI, P. P.; PINHO, J. R.; CARRILHO, F. J.; ALBUQUERQUE LUNA, E. J.; GRYSCHKEK, R. C. Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan(R) Real-Time PCR in a hamster model. **Exp. Parasitol.**, v. 143, p. 83-9, 2014a.

ESPÍRITO-SANTO, M.C.; SANCHEZ, M.C.; SANCHEZ, A.R.; ALVARADO-MORA, M.V.; CASTILHO, V.L.; GONÇALVES, E.M.; LUNA, E.J.; GRYSCHKEK, R.C. Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, n. 12, p. 2275-2284, 2014b.

FAVRE, T.C.; BOGÉA, T.H.; ROTENBERG, L.; DA SILVA, H.S.; PIERI, O.S. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 5, p. 565-567, 1995.

FERRARI, T.C. A laboratory test for the diagnosis of neuroschistosomiasis. **Neurol. Res.**, v. 32, n. 3, p. 252-262, 2010.

FLOWERS, J.R.; HAMMERBERG, B.; WOOD, S.L.; MALARKEY, D.E.; VAN DAM, G.J.; LEVY, M.G.; MCLAWHORN, L.D. *Heterobilharzia americana* infection in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 220, p. 193-196, 2002.

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.

FREITAS, A.R.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, L.J. Schistosomal myeloradiculopathy in a low-prevalence area: 27 cases (14 autochthonous) in Campinas, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 398-408, 2010.

GABRIEL, S.; DE BONT, J.; PHIRI, I.K.; MASUKU, M.; RIVEAU, G.; SCHACHT, A.M.; DEELDER, A.M.; VAN DAM, G.J.; VERCRUYSSSE, J. Transplacental transfer of schistosomal circulating anodic antigens in cows. **Parasite Immunol.**, v. 24, p. 521-525, 2002.

GABRIEL, S.; BLOCHER, J.; DORNY, P.; ABATI, E. N.; SCHMUTZHARD, E.; OMBAY, M.; MATHIAS, B.; WINKLER, A. S. Added value of antigen ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis in resource poor settings. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, p. e1851, 2012.

GARBA, A.; BARKIRÉ, N.; DJIBO, A.; LAMINE, M. S.; SOFO, B.; GOUVRAS, A.N.; BOSQUÉ-OLIVA, E.; WEBSTER, J. P.; STOTHARD, J. R.; UTZINGER, J.; FENWICK, A. Schistosomiasis in infants and preschool-aged children infection in a single *Schistosoma haematobium* and a mixed *S. haematobium*-*S. mansoni* foci of Niger. **Acta Trop.**, v. 115, p. 212-219, 2010.

GARGIONI, C.; SILVA, R.M.; THOMÉ, C.M.; QUADROS, C.M.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.

GENTILE, R.; GONCALVES, M. M.; DA COSTA NETO, S. F.; DA COSTA, M. M.; PERALTA, R. H.; PERALTA, J. M. Evaluation of immunological, parasitological and molecular methods for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy treatment with praziquantel in experimentally infected *Nectomys squamipes*. **Vet. Parasitol.**, v. 180, p. 243-249, 2011.

GOLD, R.; ROSEN, F. S.; WELLER, T. H. A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Detection of antigen in serum and urine, and correlation between antigenic concentration and worm burden. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, p. 545-551, 1969.

GOMES, A.L.; MELO, F.L.; WERKHAUSER, R.P.; ABATH, F.G. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, suppl 1, p. 133-136, 2006.

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. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 4, p. e664, 2010.

GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2014.

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 Trop.**, v. 100, p. 24-30, 2006.

GORYACHEVA, I. Y.; LENAIN, P.; DE SAEGER, S. Nanosized labels for rapid immunotests. **TrAC Trends Anal. Chem.**, v. 46, p. 30-43, 2013.

GRENFELL, R.; HARN, D.A.; TUNDUP, S.; DA'DARA, A.; SIQUEIRA, L.; COELHO, P. M. Z. New Approaches with Different Types of Circulating Cathodic Antigen for the Diagnosis of Patients with Low *Schistosoma mansoni* Load. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 2, p. e2054, 2013a.

GRENFELL, R.F.; MARTINS, W.M.; DRUMOND, S.; ANTUNES, C.M.; VOIETA, I; OTONI, A.; OLIVEIRA, A.A.; SILVA-MORAES, V.; OLIVEIRA, E.R.; OLIVEIRA, E.; LAMBERTUCCI, J.R.; FONSECA, C.T.; COELHO, P.M. Acute schistosomiasis diagnosis: a new tool for the diagnosis of schistosomiasis in an group of travelers recently infected in a new focus of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 2, p. 208-213, 2013b.

GRENFELL, R.; MARTINS, W.; SILVA-MORAES, V.; ARAUJO, N.; OLIVEIRA, E.; FONSECA, C.T; COELHO, P.M. The schistosomula tegument antigen as potential candidate for the early serological diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 75-8, 2013c.

GRENFELL, R.F.; MARTINS, W.; ENK, M.; OLIVEIRA, A.; SIQUEIRA, L.; SILVA-MORAES, V.; OLIVEIRA, E.; CARNEIRO, N.F.F.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 13, p. 328-334, 2013d.

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

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

HAMBURGER, J.; YU-XIN, X.; RAMZY, R.M.; JOURDANE, J.; RUPPEL, A. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction assay for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 468-473, 1998.

HAMILTON, J.V.; KLINKERT, M.; DOENHOFF, M.J. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. **Parasitology**, v. 117, Suppl., p. S41-S57, 1998.

HAMPL, J.; HALL, M.; MUFTI, N. A.; YAO, Y. M.; MACQUEEN, D. B.; WRIGHT, W. H.; COOPER, D. E. Upconverting phosphor reporters in immunochromatographic assays. **Anal. Biochem.**, v. 288, p. 176-187, 2001.

HANCOCK, K.; TSANG, V.C.W. Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol. Methods**, v. 92, p. 167-176, 1986.

HANELT, B.; ADEMA, C.M.; MANSOUR, M.H.; LOKER, E.S. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 3, p. 387-394, 1997.

HANEMANN, A. L.; LIBORIO, A. B.; DAHER, E. F.; MARTINS, A. M.; PINHEIRO, M. C.; SOUSA, M. S.; BEZERRA, F. S. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in patients with chronic schistosomiasis mansoni: evidences of subclinical renal inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e800421, 2013.

HASSAN, M.M.; BADAWI, M.A.; STRAND, M. Circulating schistosomal antigen in diagnosis and assessment of cure in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, p. 737-744, 1992.

HAYUNGA, E.G.; MÖLLEGARD I.; DUNCAN, J.R.J.F.; SUMNER, M.P.; STEK, J.R.M.; HUNTER, J.R.K.W. Development of circulating antigen assay for rapid detection of acute schistosomiasis. **Lancet**, v. 2, n. 8509, p. 716-718, 1986.

HOCKLEY, D.J. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Adv. Parasitol.**, v. 11, p. 233-305, 1973.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M.; DIEMERT, D.J.; PEARSON, M.; LOUKAS, A. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 814-826, 2010.

HOUBA, V.; KOECH, D.K.; STURROCK, R.F.; BUTTERWORTH, A.E.; KUSEL, J.R.; MAHMOUD, A.A. Soluble antigens and antibodies in sera from baboons infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, v. 117, p. 705-707, 1976.

HUANG, S.C-C.; FREITAS, T.C.; AMIEL, E.; EVERTS, B.; PEARCE, E.L.; LOK, J.B.; PEARCE, E.J. Fatty acid oxidation is essential for egg production by the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathog.**, v. 8, p. 10, p. e1002996, 2012.

HUNG, Y. W.; REMAIS, J. Quantitative detection of *Schistosoma japonicum cercariae* in water by real-time PCR. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 11, p. e337, 2008.

IBIRONKE, O.; KOUKOUNARI, A.; ASAOLU, S.; MOUSTAKI, I.; SHIFF, C. Validation of a new test for *Schistosoma haematobium* based on detection of Dra1 DNA fragments in urine: evaluation through latent class analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, p. e1464, 2012.

IGREJA, R. P.; MATOS, J. A.; GONCALVES, M. M.; BARRETO, M. M.; PERALTA, J. M. Schistosoma mansoni-related morbidity in a low-prevalence area of Brazil: a comparison between egg excretors and seropositive non-excretors. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 101, p. 575-584, 2007.

ISMAIL, M.M.; JAMES, C.; WEBBE, G. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of circulating antigen and antibody in Schistosoma haematobium infected baboons. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 4, p. 542-548, 1984.

JANNOTTI-PASSOS, L. K.; VIDIGAL, T.H.; DIAS-NETO, E.; PENA, S.D.; SIMPSON, A.J.; DUTRA, W.O.; SOUZA, C.P.; CARVALHO-PARRA, J.F. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Shistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 3, p. 395-399, 1997.

JOHANSEN, M.V.; SITHITHAWORN, P.; BERGQUIST, R.; UTZINGER, J., Towards improved diagnosis of zoonotic trematode infections in Southeast Asia. **Adv. Parasitol.**, v. 73, p. 171-195, 2010.

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.

KANE, R. A.; STOTHARD, J. R.; ROLLINSON, D.; LECLIPTEUX, T.; EVRAERTS, J.; STANDLEY, C. J.; ALLAN, F.; BETSON, M.; KABA, R.; MERTENS, P.; LAURENT, T. Detection and quantification of schistosome DNA in freshwater snails using either fluorescent probes in real-time PCR or oligochromatographic dipstick assays targeting the ribosomal intergenic spacer. **Acta Trop.**, v. 128, n. 2, p. 241-249, 2013.

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

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, n. 3, p. 325-329, 2010.

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

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252003000100024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 maio 2012.

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

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KEISER, J.; INGRAM, K.; UTZINGER, J. Antiparasitic drugs for paediatrics: systematic review, formulations, pharmacokinetics, safety, efficacy and implications for control. **Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1620-1632, 2011.

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

KINKEL, H.F.; DITTRICH, S.; BÄUMER, B.; WEITZEL, T. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 6, p. 948-953, 2012.

KJETLAND, E. F.; HOVE, R. J.; GOMO, E.; MIDZI, N.; GWANZURA, L.; MASON, P.; FRIIS, H.; VERWEIJ, J. J.; GUNDERSEN, S. G.; NDHLOVU, P. D.; MDULUZA, T.; VAN LIESHOUT, L. Schistosomiasis PCR in vaginal lavage as an indicator of genital *Schistosoma haematobium* infection in rural Zimbabwean women. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 6, p. 1050-1055, 2009.

KNOPP, S.; RINALDI, L.; KHAMIS, I.S.; STOTHARD, J.R.; ROLLINSON, D.; MAURELLI, M.P.; STEINMANN, P.; MARTI, H.; CRINGOLI, G.; UTZINGER, J. A single FLOTAC is more sensitive than triplicate Kato-Katz for the diagnosis of low-intensity soil-transmitted helminth infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, n. 4, p. 347-354, 2009.

KNOPP, S.; BECKER, S.L.; INGRAM, K.J.; KEISER, J.; UTZINGER, J. Diagnosis and treatment of schistosomiasis in children in the era of intensified control. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 11, n. 11, p. 1237-1258, 2013.

KONGS, A.; MARKS, G.; VERLE, P.; VAN DER STUYFT, P. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluation *S. mansoni* infections. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, p. 163-169, 2001.

KREMSNER, P. G.; DE JONGE, N.; SIMARRO, P. P.; MUHLSCHLEGEL, F.; MIR, M.; SIMA, F. O.; FELDMEIERS, H.; BIENZLE, U.; DEELDER, A. M. Quantitative determination of circulating anodic and cathodic antigens in serum and urine of individuals infected with *Schistosoma intercalatum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 2, p. 167-169, 1993.

KREMSNER, P.G.; ENYONG, P.; KRIJGER, F.W.; DE JONGE, N.; ZOTTER, G.M.; THALHAMMER, F.; MUHLSCHLEAGEL, F.; BIENZLE, U.; FELDMEIERS, H.; DEELDER A.M. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine from *Schistosoma haematobium* infected Cameronian children receiving praziquantel. **Clin. Inf. Dis.**, v. 18, p. 405-413, 1994.

KUNINGAS, K.; UKONAHO, T.; PAKKILA, H.; RANTANEN, T.; ROSENBERG, J.; LOVGREN, T.; SOUKKA, T. Upconversion fluorescence resonance energy transfer in a homogeneous immunoassay for estradiol. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 4690-4696, 2006.

LAMBERTON, P.H.L.; KABATEREINE, N.B.; OGUTTU, D.W.; FENWICK, A.; WEBSTER, J.P. Sensitivity and Specificity of Multiple Kato-Katz Thick Smears and a

Circulating Cathodic Antigen Test for *Schistosoma mansoni* Diagnosis Pre- and Post-repeated-Praziquantel Treatment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 9, p. e3139, 2014.

LAWRENCE, J.D. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 59, p. 60-63, 1973.

LEAL, J.K.F. **Diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade através do POC-CCA:** comparação com outros métodos e avaliação pós-tratamento. 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

LEGESSE, M.; ERKO, B. Field-based evaluation of a reagent strip test for diagnosis of *Schistosoma mansoni* by detecting circulating cathodic antigen in urine before and after chemotherapy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, p. 668-673, 2007.

LENZI, H.L.; JURBERG, A.D.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, J.A. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. (Org.). **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. cap. 3, p. 87-145.

LEUTSCHER, P. D.; VAN DAM, G. T.; REIMERT, C.M.; RAMARAKOTO, C. E.; DEELDER, A.M.; ORNBJERG, N. Eosinophil cationic protein, soluble egg antigen, circulating anodic antigen, and egg excretion in male urogenital schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 422-426, 2008.

LI, L.; ZHOU, L.; YU, Y.; ZHU, Z.; LIN, C.; LU, C.; YANG, R. Development of up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay for rapidly quantitative detection of hepatitis B surface antibody. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 63, n. 2, p.165-172, 2009.

LIN, D.D.; XU, J.M.; ZHANG, Y.Y.; LIU, Y.M.; HU, F.; XU, X.L.; LI, J.Y.; GAO, Z.L.; WU, H.W.; KURTIS, J.; WU, G.L. Evaluation of IgG-ELISA for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* in a high prevalence, low intensity endemic area of China. **Acta Trop.**, v. 107, n. 2, p. 128-133, 2008a.

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, p. 281-286, 2008b.

LODH, N.; NAPLES, J.M.; BOSOMPEN, K.M.; QUARTEY, J.; SHIFF, C.J. Detection of Parasite Specific DNA in Urine Sediment Obtained by Filtration Differentiates between Single and Mixed Infections of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* from Endemic Areas in Ghana. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p.e91144, 2014.

MAKAROVA, E.; GOES, T.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Detection of IgG binding to *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26 is a sensitive and specific method for acute schistosomiasis diagnosis. **Parasitol. Int.**, v. 54, n. 1, p. 69-74, 2005.

- MAKAROVA, E.; GOES, T.S.; MARCATTO, A.L.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. **Parasitol. Int.**, v. 52, n. 4, p. 269-279, 2003.
- MARTINS-MELO, F. R.; PINHEIRO, M. C.; RAMOS, A. N., JR.; ALENCAR, C. H.; BEZERRA, F. S.; HEUKELBACH, J. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 14, p. 1055-1062, 2014.
- MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S.C.; ENK, M.J.; CARVALHO, O.S. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 7, p. 1709-1712, 2008.
- 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.
- MCMANUS, D.P.; GRAY, D.J.; ROSS, A.G.; WILLIAMS, G.M.; HE, H.B.; LI, Y.S. Schistosomiasis research in the dongting lake region and its impact on local and national treatment and control in China. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 8, p. e1053, 2011.
- MELMAN, S.D.; STEINAUER, M.L.; CUNNINGHAM, C.; KUBATKO, L.S.; MWANGI, I.N.; WYNN, N.B.; MUTUKU, M.W.; KARANJA, D.M.S.; COLLEY, D.G.; BLACK, C.L.; SECOR, W.E.; MKOJI, G.M.; LOKER, E.S. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e504, 2009.
- MELO, F. L.; GOMES, A. L.; BARBOSA, C. S.; WERKHAUSER, R. P.; ABATH, F. G. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 11, p. 1049-1055, 2006.
- MELTZER, E.; ARTOM, G.; MARVA, E.; ASSOUS, M.V.; RAHAV, G.; SCHWARTZT, E. Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n. 11, p. 1696-1700, 2006.
- MENDOZA, N.; LI, A.; GILL, A.; TYRING, S. Filariasis: diagnosis and treatment. **Dermatol. Ther.**, v. 22, n. 6, p. 475-490, 2009.
- MIDZI, N.; BUTTERWORTH, A.E.T.; MDULUZA, T.S.; MUNYATI, S.; DEELDER, A.M.; VAN DAM, G.J. Use of circulating cathodic antigen strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p. 45-51, 2009.
- MILLER, R.L.; ARMELAGOS, G.J.; IKRAM, S.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F.W.; DEELDER, A.M. Palaeoepidemiology of *Schistosoma* infection in mummies. **Br. Med. J.**, v. 304, p. 555- 556, 1992.

- MOKKAPATI, V. K.; SAM NIEDBALA, R.; KARDOS, K.; PEREZ, R. J.; GUO, M.; TANKE, H. J.; CORSTJENS, P. L. Evaluation of UPLink-RSV: prototype rapid antigen test for detection of respiratory syncytial virus infection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1098, p. 476-485, 2007.
- MUTAPI, F.; RUJENI, N.; BOURKE, C.; MITCHELL, K.; APPLEBY, L.; NAUSCH, N.; MIDZI, N.; MDULUZA, T. Schistosoma haematobium treatment in 1–5 year old children: safety and efficacy of the antihelminthic drug praziquantel. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1143, 2011.
- NAMWANJE, H.; KABATEREINE, N. B.; OLSEN, A. The acceptability and safety of praziquantel alone and in combination with mebendazole in the treatment of Schistosoma mansoni and soil-transmitted helminthiasis in children aged 1–4 years in Uganda. **Parasitology**, v. 138, p. 1586-1592, 2011.
- NASH, T. E. Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, p. 1085- 1087, 1974.
- NASH, T.E.; DEELDER, A.M. Comparison off our schistosome excretory-secretory antigens: phenol-sulfuric test active peak, cathodic circulating antigen, gut-associated proteoglycan, and circulating anodic antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 236-241, 1985.
- NASH, T.E.; NASIR, U.D.; JEANLOZ, R.W. Further purification and characterization of a circulating antigen in schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 119, p. 1627- 1633, 1977.
- NASH, T.E.; PRESCOTT, B.; NEVA, F.A. The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 112, p. 1500 -1507, 1974.
- NAUSCH, N.; DAWSON, E.M.; MIDZI, N.; MDULUZA, T.; MUTAPI, F.; DOENHOFF, M. J. Field evaluation of a new antibody-based diagnostic for Schistosoma haematobium and S. mansoni at the point-of-care in northeast Zimbabwe. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, p. 165, 2014.
- NICOLLS, D.J.; WELD, L.H.; SCHWARTZ, E.; REED, C.; VON SONNENBURG ,F.; FREEDMAN, D.O.; KOZARSKY, P.E.; GESENTINEL SURVEILLANCE NETWORK. Characteristics of schistosomiasis in travelers reported to the GeoSentinel Surveillance Network 1997-2008. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 729-734, 2008.
- NIEDBALA, R. S.; FEINDT,H.; KARDOS, K.; VAIL, T.; BURTON, J.; BIELSKA, B.; LI, S.; MILUNIC, D.; BOURDELLE, P.; VALLEJO, R. Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology. **Anal. Biochem.**, v. 293, n. 1, p. 22-30, 2001.
- NJIRU, Z.K. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, p. e1572, 2012.
- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N., HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 12, p. E63, 2000.
- NOUR EL DIN, M.S.; NIBBELING, R.; ROTMANS, J.P.; POLDERMAN, A.M.; KRIJGER, F.W.; DEELDER, A.M. Quantitative determination of circulating soluble egg antigen in urine

and serum of *Schistosoma mansoni*-infected individuals using a combined two-site enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, p. 585-594, 1994.

NOYA, B.A.; GUEVARA, R.R.; COLMENARES, C.; LOSADA, S.; NOYA, O. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl. 1, p. 29-35, 2006.

NOYA, O.; ALARCÓN DE NOYA, B.; GUZMÁN, F.; BERMÚDEZ, H. Immunogenicity of Sm32 synthetic peptides derived from the *Schistosoma mansoni* adult worm. **Immunol. Lett.**, v. 88, n. 3, p. 211-9, 2003.

NOYA, O.; DE NOYA, B.A.; BALLEEN, D.E.; BERMÚDEZ, H.; BOUT, D.; HOEBEKE, J. Immunogenicity of synthetic proteins from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasite Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 567-573, 2001.

OBENG, B.B.; ARYEETEEY, Y.A.; DE DOOD, C.J.; AMOAH, A.S.; LARBI, I.A.; DEELDER, A.M.; YAZDANBAKHSI, M.; HARTGERS, F.C.; BOAKYE, D.A.; VERWEIJ, J.J.; VAN DAM, G.J.; VAN LIESHOUT, L. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine samples from Ghana. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 102, n. 7, p. 625-633, 2008.

OKABE, K.; TANAKA, T. A new urine precipitation reaction for schistosomiasis japonica, a preliminary report. **Karame Med. J.**, v. 5, p. 45-52, 1958.

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

OLIVEIRA, M.F.; D'AVILA, J.C.P.; TORRES, C.R.; OLIVEIRA, P.L.; TEMPONE, A.J.; RUMJANEK, F.D.; BRAGA, C.M.S.; SILVA, J.R.; DANSA-PETRETSKI, M.; OLIVEIRA, M.A.; SOUZA, W.; FERREIRA, S.T. *Haemozoin* in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p. 217-221, 2000.

OLLIARO, P.L.; VAILLANT, M.T.; BELIZARIO, V.J.; LWAMBO, N.J.; OULDABDALLAHI, M.; PIERI, O.S.; AMARILLO, M.L.; KAATANO, G.M.; DIAW, M.; DOMINGUES, A.C.; FAVRE, T.C.; LAPUJADE, O.; ALVES, F.; CHITSULO, L. A multicentre randomized controlled trial of the efficacy and safety of single-dose praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for treating intestinal schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 6, p. e1165, 2011.

OLSON, P.D.; CRIBB, T.H.; TKACH, V.V.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 733-755, 2003.

OUELLETTE, A.L.; LI, J.J.; COOPER, D.E.; RICCO, A.J.; KOVACS, G.T. Evolving point-of-care diagnostics using up-converting phosphor bioanalytical systems. **Anal. Chem.**, v. 81, n. 9, p. 3216-3221, 2009.

PARAENSE, W.L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. (Org.). *Schistosoma mansoni & Esquistossomose*: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008a. cap. 8, p. 287-308.

PARAENSE, W.L. Histórico do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. (Org.). *Schistosoma mansoni & Esquistossomose*: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008b. cap. 1, p. 31-41.

PEELING, R.W.; SMITH, P.G.; BOSSUYT, P.M. A guide for diagnostic evaluations. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, n. 9 Suppl., p. S2-6, 2006.

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, 15., Pelotas, 2006. **Anais...** Pelotas: Editora da UFPEL, 2006.

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

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

POLMAN, K.; STELMA, F.F.; GRYSEELS, B.; VAN DAM, G.J.; TALLA, I.; NIANG, M.; VAN LIESHOUT, L.; DEELDER, A.M. Epidemiologic application of circulating antigen detection in a recent *Schistosoma mansoni* focus in northern Senegal. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 152-157, 1995.

POLMAN, K.; DIAKHATE, M.M.; ENGELS, D.; NAHIMANA, S.; VAN DAM, G.J.; FALCÃO FERREIRA, S.T.; DEELDER, A.M.; GRYSEELS, B. Specificity of circulating antigen detection for schistosomiasis mansoni in Senegal and Burundi. **Trop. Med. Int. Health**, v. 5, n. 8, p. 534-537, 2000.

POLMAN, K., STELMA, F. F.; LE CESSIE, S.; DE VLAS, S. J.; FALCAO FERREIRA, S. T.; TALLA, I.; DEELDER, A. M.; GRYSEELS, B. Evaluation of the patterns of *Schistosoma mansoni* infection and re-infection in Senegal, from faecal egg counts and serum concentrations of circulating anodic antigen. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 96, p. 679-689, 2002.

PONTES, L.A.; DIAS-NETO, E; RABELO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human sérum and feces. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 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. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, p. 652-656, 2003.

PONTES, R.J.S.; NATIONS, M.K.; ARDO, C.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 II): Evolução dos Indicadores Epidemiológicos, 1977 – 1994. **Rev. Med. UFC**, v. 39, n. 1-2, p. 37-53, 1999.

QU, Q.; ZHU, Z.; WANG, Y.; ZHONG, Z.; ZHAO, J.; QIAO, F.; DU, X.; WANG, Z.; YANG, R.; HUANG, L.; YU, Y.; ZHOU, L.; CHEN, Z. Rapid and quantitative detection of *Brucella* by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay. **J. Microbiol. Methods**, v. 79, n. 1, p. 121-123, 2009.

QUIAN, Z.L.; DEELDER, A.M. *Schistosoma japonicum*: immunological characterization and detection of circulating polysaccharide antigens from adult worms. **Exp. Parasitol.**, v. 55, p. 168, 1983.

RABELLO, A.; PONTES, L.A.; ENK, M.; MONTENEGRO, S.M.; MORAIS, C.N.L.; Diagnostico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z; LENZI H. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p. 897-925.

REY, L. *Schistosoma* e esquistossomíase: a doença. *Schistosoma* e esquistossomíase: epidemiologia e controle. In: REY, L. (Org.). **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RIBEIRO, P.J.; AGUIAR, L.A.K.; TOLEDO C.F.; BARROS, S.M.O.; BORGES, D.R. Programa educativo em esquistossomose: modelo de abordagem metodológico. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 415-421, 2004.

RIPERT, C.; COMBE, A.; DAULOUEDE, S.; APPRIOU, M.; TRIBOULEY-DURET, J.; TRIBOULEY, J.; MOYOU-SOMO, R.; SAME-EKOBO, A.; AMBASSA, P. Detection with a monoclonal antibody of an antigen characteristic of the genus *Schistosoma* excreted in the urine. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 39, p. 131-135, 1988.

ROLLINSON, D.; KNOPP, S.; LEVITZ, S.; STOTHARD, J. R.; TCHUEM TCHUENTE, L. A.; GARBA, A.; MOHAMMED, K. A.; SCHUR, N.; PERSON, B.; COLLEY, D. G.; UTZINGER, J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Trop.**, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013.

SABAH, A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M.J. *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. **Exp. Parasitol.**, v. 60, n. 3, p. 348-354, 1985.

SABAH, A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M.J. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Exp. Parasitol.**, v. 61, n. 3, p. 294-303, 1986.

SANDOVAL, N.; SILES-LUCAS, M.; LOPEZ ABAN, J.; PEREZ-ARELLANO, J. L.; GARATE, T.; MURO, A. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. **Exp. Parasitol.**, v. 114, n. 2, p. 84-88, 2006a.

SANDOVAL, N.; SILES-LUCAS, M.; PÉREZ-ARELLANO, J.L.; CARRANZA, C.; PUENTE, S.; LÓPEZ-ABÁN, J. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. **Parasitology**, v. 133, pt. 5, p. 581-587, 2006b.

SANTORO, F.; BOROJEVIC, R.; BOUT, D.; TACHON, P.; BINA, J.C.; CAPRON, A. Mother-child relationship in human schistosomiasis mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 1164- 1168, 1977.

SANTOS, M.M. A. G.; GARCIA, T. C.; ORSINI, M.; DISCH, J.; KATZ, N.; RABELLO, A. Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, p. 289-292, 2000.

SÃO PAULO. 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).

SAYED, A.A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C.J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C.P.; WILLIAMS, D.L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nat. Med.**, v. 14, p. 407-412, 2008.

SCHWARZ, N. G.; RAKOTOZANDRINDRAINNY, R.; HERINIAINA, J. N.; RANDRIAMAMPIONONA, N.; HAHN, A.; HOGAN, B.; FRICKMANN, H.; DEKKER, D.; POPPERT, S.; RAZAFINDRABE, T.; RAKOTONDRAINARIVELO, J. P.; MAY, J.; HAGEN, R. M. *Schistosoma mansoni* in schoolchildren in a Madagascan highland school assessed by PCR and sedimentation microscopy and Bayesian estimation of sensitivities and specificities. **Acta Trop.**, v. 134, p. 89-94, 2014.

SHANE, H.L.; VERANI, J.R.; ABUDHO, B.; MONTGOMERY, S.P.; BLACKSTOCK, A.J.; MWINZI, P.N.; BUTLER, S.E.; KARANJA, D.M.; SECOR, W.E. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in western Kenya. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 1, p. e951, 2011.

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. 211-213, 1995.

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

SOBH, M.A.; MOUSTAFA, F.E.; EL HOUSSEINI, F.; BASTA, M.T.; DEELDER, A.M.; GHONEIM, M.A. Schistosomal specific nephropathy leading to end-stage renal failure. **Kidney Int.**, v. 31, p. 1006 -1011, 1987.

SOBH, M. A.; MOUSTAFA, F. E.; SALLY, S. M.; DEELDER, A. M.; GHONIEM, M. A. Characterisation of kidney lesions in early schistosomal-specific nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 3, n. 4, p. 392-398, 1988.

SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; DAY, M.; BETSON, M.; KABATEREINE, N. B.; STOTHARD, J. R. An inclusive dose pole for treatment of schistosomiasis in infants and preschool children with praziquantel. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, p. 740-742, 2010a.

SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; PLEASANT, J.; DAY, M.; BETSON, M.; ROLLINSON, D.; MONTRESOR, A.; KAZIBWE, F.; KABATEREINE, N. B.; STOTHARD, J. R. Treatment of intestinal schistosomiasis in Ugandan preschool children: best diagnosis, treatment efficacy and side-effects, and an extended praziquantel dosing pole. **Int. Health**, v. 2, p. 103-113, 2010b.

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

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Inf. Dis.**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

STEK, M.J.R.; COULIS, P.A.; BOCTOR, F.N.; PELLELY, R.P.; Reactivity of anti-MSA-1 monoclonal antibody with schistosomal and non-schistosomal antigenic extracts. **Lancet**, v. 2, n. 8348, p. 522-523, 1983.

STELMA, F.F.; TALLA, I.; SOW, S.; KONGS, A.; NIANG, M.; POLMAN, K.; DEELDER, A.M.; GRYSSELS, B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 2, p. 167-170, 1995.

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

STOTHARD, J.R.; SOUSA-FIGUEREIDO, J.C.; BETSON, M, ADRIKO, M.; ARINAITWE, M.; *et al.* *Schistosoma mansoni* infections in young children: when are schistosome antigens in urine, eggs in stool and antibodies to eggs first detectable? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e938, 2011a.

STOTHARD, J.R.; SOUSA-FIGUEIREDO, J.C.; BETSON, M.; GREEN, H.K.; SETO, E.Y.; GARBA, A.; SACKO, M.; MUTAPI, F.; VAZ NERY, S.; AMIN, M.A.; MUTUMBA-NAKALEMBE, M.; NAVARATNAM, A.; FENWICK, A.; KABATEREINE, N.B.; GABRIELLI, A.F.; MONTRESOR, A. Closing the praziquantel treatment gap: new steps in epidemiological monitoring and control of schistosomiasis in African infants and preschool-aged children. **Parasitology**, v. 138, n. 12, p. 1593-1606, 2011b.

STOTHARD, J.R.; SOUSA-FIGUEIREDO, J.C.; BETSON, M.; BUSTINDUY, A.; REINHARD-RUPP, J. Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated! **Trends Parasitol.**, 29: 197-205, 2013a.

STOTHARD, J.R.; SOUSA-FIGUEIREDO, J.C.; NAVARATNAM, A.M. Advocacy, policies and practicalities of preventive chemotherapy campaigns for African children with schistosomiasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 11, n. 7, p. 733-752, 2013b.

SUBRUNGRUANG, I.; MUNGTHIN, M.; CHAVALITSHEWINKOON- PETMITR, P.; RANGSIN, R.; NAAGLOR, T.; LEELAYOOVA, S. Evaluation of DNA extraction and PCR methods for detection of *Enterocytozoon bienuesi* in stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 3490–3494, 2004.

SULAHIAN, A.; GARIN, Y.J.; IZRI, A.; VERRET, C.; DELAUNAY, P.; VAN GOOL, T.; *et al.* Development and evaluation of a Western Blot Kit for diagnosis of schistosomiasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.12, n. 4, p. 548-551, 2005.

SULBARAN, G.S.; BALLEEN, 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, n. 1, p. 20-28, 2010.

TANAKA, T.; KANEDA, Y.; ILDA, 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 Fields. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 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.

THÉTIOT-LAURENT, S. A.; BOISSIER, J.; ROBERT, A.; MEUNIER, B. Schistosomiasis chemotherapy. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 52, n. 31, p. 7936-7956, 2013.

TIBIRIÇÁ, S.H.C.; BESSA, E.C.A.; MITTHEROFHE, A.; CASTRO, M.F.; CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L.; PASSOS, L.K.J.; MATTOS, A.M.M.; PINHEIRO, I.S.; SILVA, D.S.; BASTOS, F.O.; ANDREOLLI, G.Q.; BONATO, G.; COIMBRA, E.S. *Biomphalaria* spp. (Preston, 1910) snails in the municipality of Zona da Mata Mineira mesoregion, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, suppl. 1, p. 179-184, 2006.

TORRES, E.A.; ACOSTA, H.; CRUZ, M.; WEINSTOCK, J.; HILLYER, G.V.; Seroprevalence of *Schistosoma mansoni* in Puerto Ricans with inflammatory bowel disease. **P. R. Health Sci. J.**, v. 20, n. 3, p. 211-214, 2001.

TURNER, P.; LALLOO, K.; BLIGH, J.; ARMSTRONG, M.; WHITTY, C.J.; DOENHOFF, M.J.; CHIODINI, P.L.; Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, n. 11, p. 1193-1196, 2004.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E.K.; N'DRI, A.; LENGELER, C.; TANNER, M. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. **Trop. Med. Int Health**, v. 5, n. 11, p. 771-778, 2000.

UTZINGER, J.; ZHOU, X.N.; CHEN, M.G.; BERGQUIST, R. Conquering schistosomiasis in China: the long march. **Acta Trop.**, v. 96, p. 69-96, 2005.

UTZINGER, J.; N'GORAN E, K.; CAFFREY, C. R.; KEISER, J. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Trop.**, v. 120, n. 1, p. S121-137, 2011.

VAN DAM, G. J.; SEINO, J.; ROTMANS, J. P.; DAHA, M. R.; DEELDER, A. M. *Schistosoma mansoni* circulating anodic antigen but not circulating cathodic antigen interacts with complement component C1q. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 2807-2812, 1993.

VAN DAM, G.J.; BERGWERFF, A.A.; THOMAS-OATES, J.E.; ROTMANS, J.P.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.G; DEELDER, A.M. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from Circulating Cathodic Antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. **Eur. J. Biochem.**, v. 225, p. 467-482, 1994.

VAN DAM, G.J.; BOGITSH, B.J.; VAN ZEYL, R.J.; ROTMANS, J.P.; DEELDER, A.M. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 557-564, 1996a.

VAN DAM, G.J.; CLAAS, F.H.; YAZDANBAKHS, M.; KRUIZE, Y.C.; VAN KEULEN, A.C.; FERREIRA, S.T.; ROTMANS, J.P.; DEELDER, A.M. *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. **Blood**, v. 88, p. 4246-4251, 1996b.

VAN DAM, G. J.; STELMA, F. F.; GRYSEELS, B.; FALCAO FERREIRA, S. T.; TALLA, I.; NIANG, M.; ROTMANS, J. P.; DEELDER, A.M. Antibody response patterns against *Schistosoma mansoni* in a recently exposed community in Senegal. **J. Inf. Dis.**, v. 173, p. 1232-1241, 1996c.

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

VAN DAM, G. J.; DE DOOD, C. J.; LEWIS, M.; DEELDER, A.M.; VAN LIESHOUT, L.; TANKE, H. J.; VAN ROOYEN, L.H.; CORSTJENS, P. L. A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen. **Exp. Parasitol.**, v. 135, p. 274-282, 2013.

VAN DAM, G. J.; XU, J.; BERGQUIST, R.; DE DOOD, C. J.; UTZINGER, J.; QIN, Z. Q.; GUAN, W.; FENG, T.; YU, X. L.; ZHOU, J.; ZHENG, M.; ZHOU, X. N.; CORSTJENS, P. L. An ultra-sensitive assay targeting the circulating anodic antigen for the diagnosis of

Schistosoma japonicum in a low-endemic area, People's Republic of China. **Acta Trop.**, v. 141, pt. B, p. 190-197, 2014a.

VAN DAM, G. J.; ODERMATT, P.; ACOSTA, L.; BERGQUIST, R.; DE DOOD, C. J.; KORNELIS, D.; MUTH, S.; UTZINGER, J.; CORSTJENS, P. L. Evaluation of banked urine samples for the detection of circulating anodic and cathodic antigens in *Schistosoma mekongi* and *S. japonicum* infections: A proof-of-concept study. **Acta Trop.**, v. 141, pt. B, p. 198-203, 2014b.

VAN LIESHOUT, L. **Detection of the circulating antigens CAA and CCA in human *Schistosoma* infections:** immunodiagnostic and epidemiological applications. Thesis (Doctor) - Rijksuniversiteit te Leiden, 1996. p. 11-16.

VAN LIESHOUT, L.; DE JONGE, N.; BASSILY, S.; MANSOUR, M.M.; DEELDER, A.M. Assessment of cure in schistosomiasis patients after chemotherapy with praziquantel by quantitation of circulating anodic antigen (CAA) in urine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 3, p. 323-328, 1991.

VAN LIESHOUT, L.; DE JONGE, N.; EL MASRY, N.A.; MANSOUR, M.M.; KRIJGER, F.W.; DEELDER A.M. Improved diagnostic performance of the circulating antigen assay in human schistosomiasis by parallel testing for circulating anodic and cathodic antigens in serum and urine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 463-469, 1992.

VAN LIESHOUT, L.; DE JONGE, N.; EL-MASRY, N.; MANSOUR, M.M.; BASSILY, S.; KRIJGER, F.W.; DEELDER, A.M. Monitoring the efficacy of different doses of praziquantel by quantification of circulating antigens in serum and urine of schistosomiasis patients. **Parasitology**, v. 108, p. 5, p. 519-526, 1994.

VAN LIESHOUT, L.; PANDAY, U.G.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F.W.; OOSTBURG, B.F.; POLDERMAN, A.M.; DEELDER, A.M. Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic area in Surinam by determination of the circulating antigens CAA and CCA. **Acta Trop.**, v. 59, p. 19-29, 1995a.

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A.M.; DE VLAS, S.J.; DE CALUWÉ, P.; KRIJGER, F.W.; GRYSEELS, B.; DEELDER, A.M. Analysis of worm burden variation in human *Schistosoma mansoni* infections by determination of serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 1336-1342, 1995b.

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A.M.; VISSER, L.G.; VERWEY, J.J.; DEELDER, A.M. Detection of the circulating antigens CAA and CCA in a group of Dutch travellers with acute schistosomiasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 2, p. 551-557, 1997.

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

VAN'T WOUT, A.B.; DE JONGE, N.; TIU W.; GARICIA, E.E.; MITCHELL, G.F.; DEELDER, A.M. Schistosome circulating anodic antigen in serum of individuals infected with *Schistosoma japonicum* from the Philippines before and after chemotherapy with praziquantel. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 4, p. 410-413, 1992.

VERANI, J. R.; ABUDHO, B.; MONTGOMERY, S. P.; MWINZI, P.N.M.; SHANE, H.L.; BUTLER, S.E.; KARANJA, D.M.S.; SECOR, W. E. Schistosomiasis among Young Children in Usoma, Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 5, p. 787-791, 2011.

VERONESI, R. Histórico da esquistossomose. In: _____. **Doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1985.

VIDIGAL, T. H.; MAGALHAES, K. G.; KISSINGER, J. C.; CALDEIRA, R. L.; SIMPSON, A. J.; CARVALHO, O. S. A. Multiplex-PCR approach to identification of the Brazilian intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, suppl 1, p. 95-97, 2002.

VINKELES MELCHERS, N. V.; VAN DAM, G. J.; SHAPROSKI, D.; KAHAMA, A. I.; BRIENEN, E. A.; VENNERVALD, B. J.; VAN LIESHOUT, L. Diagnostic performance of *Schistosoma* real-time PCR in urine samples from Kenyan children infected with *Schistosoma haematobium*: day-to-day variation and follow-up after praziquantel treatment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 4, p. e2807, 2014.

VON LICHTENBERG, F.; BAWDEN, M.P.; SHEALEY, S.H. Origin of circulating antigen from the schistosome gut. An immunofluorescent study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, n. 6, p. 1088-1091, 1974.

WANG, Z. J.; XUE, C. L.; LOU, W.X.; ZHANG, X. Y.; ZHANG, E. Y.; WU, W. D.; SHEN, G. J. Non-invasive immunodiagnosis of *Schistosomiasis japonica*: the detection of specific antibodies in saliva. **Chin. Med. J.**, v. 115, p. 1460-1464, 2002.

WANG, C.; CHEN, L.; YIN, X.; HUA, W.; HOU, M.; JI, M.; YU, C.; WU, G. Application of DNA-based diagnostics in detection of schistosomal DNA in early infection and after drug treatment. **Parasit. Vectors**, v. 4, p. 164, 2011.

WEN, L.Y.; CHEN, J.H.; DING, J.Z.; ZHANG, J.F.; LU, S.H.; YU, L.L.; SHEN, L.Y.; WU, G.L.; ZHOU, X.N.; ZHENG, J. Evaluation on the applied value of the dot immunogold filtration assay (DIGFA) for rapid detection of anti-*Schistosoma japonicum* antibody. **Acta Trop.**, v. 96, n. 2-3, p. 142-147, 2005.

WICHMANN, D.; PANNING, M.; QUACK, T.; KRAMME, S.; BURCHARD, G.D.; GREVELDING, C.; DROSTEN, C. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 4, p. e422, 2009.

WICHMANN, D.; POPPERT, S.; VON THIEN, H.; CLERINX, J.; DIECKMANN, S.; JENSENIUS, M.; PAROLA, P.; RICHTER, J.; SCHUNK, M.; STICH, A.; ZANGER, P.; BURCHARD, G.D.; TANNICH, E. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, p. 55, 2013.

WILSON, R.A.; VAN DAM, G.J.; KARIUKI, T.M.; FARAH, I.O.; DEELDER, A.M.; COULSON, P.S.; The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis *mansoni* established by a study in non-human primates. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 1241-1244, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Report of the WHO informal consultation on the use of praziquantel during pregnancy/lactation and albendazole/mebendazole in children under 24 months (WHO/CDS/CPE/PVC/2002.4)**. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers**. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Elimination of schistosomiasis**. 65th World Health Assembly, resolution WHA65.21 agenda item 13.11, Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**, Fact Sheet No. 115. Geneva, 2014). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 11 out. 2014.

WU, G. A historical perspective on the Immunodiagnosis of schistosomiasis in China. **Acta Trop.**, v. 82, p. 193-198, 2002.

XIAO, X.; WANG, T.; YE, H.; QIANG, G.; WEI, H.; TIAN, Z. Field evaluation of a rapid, visually-read colloidal dye immunofiltration assay for *Schistosoma japonicum* for screening in areas of low transmission. **Bull. World Health Organ.**, v. 83, n. 7, p. 526-533, 2005.

XU, J.; FENG, T.; LIN, D.D.; WANG, Q.Z.; TANG, L.; WU, X.H.; GUO, J.G.; PEELING, R.W.; ZHOU, X.N. Performance of a dipstick dye immunoassay for rapid screening of *Schistosoma japonicum* infection in areas of low endemicity. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 87, 2011.

YAN, Z.; ZHOU, L.; ZHAO, Y.; WANG, J.; HUANG, L.; HU, K.; LIU, H.; WANG, H.; GUO, Z.; SONG, Y.; HUANG, H.; YANG, R. Rapid quantitative detection of *Yersinia pestis* by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor. **Sens. Actuators B Chem.**, v. 119, n. 2, p. 656-663, 2006.

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

ZARLING, D. A.; ROSSI, M. J.; PEPPERS, N. A.; KANE, J.; FARIS, G.W.; DYER, M. J.; NG, S. Y.; SCHNEIDER, L. V. Up-converting reporters for biological and other assays using laser excitation techniques. **United States Patent 5674698 A**, 1997.

ZATZ, R.; ROMÃO, J. E.; NORONHA, I. L. Nephrology in Latin America, with special emphasis on Brazil. **Kidney Int.**, v. 83, p. 131-134, 2003.

ZHOU, X-N; XU, J.; CHEN, H-G.; WANG, T-P.; HUANG X-B; LIN, D.D.; WANG, Q.Z.; TANG, L.; GUO, J.G.; WU, X.H.; FENG, T.; CHEN, J.X.; GUO, J.; CHEN, S.H.; LI, H.; WU, Z.D.; PEELING, R.W. Tools to support policy decisions related to treatment strategies and surveillance of *Schistosomiasis japonica* towards elimination. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 2, p. e1408, 2011b.

ZHOU, Y.B.; ZHENG, H.M.; JIANG, Q.W. A diagnostic challenge for Schistosomiasis japonica in China: consequences on praziquantel-based morbidity control. **Parasit Vectors.** v. 4, p. 194, 2011a.

ZHU, Y.C. Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review. **Acta Trop.**, v. 96, p.130-136, 2005.

ZIJLMANS, H. J. M. A. A.; BONNET, J.; BURTON, J.; KARDOS, K.; VAIL, T.; NIEDBALA, R. S.; TANKE, H. J. Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: a new reporter technology. **Anal. Biochem.**, v. 267, p. 30-36,1999.

ZUIDERWIJK, M.; TANKE, H. J.; NIEDBALA, S. R.; CORSTJENS, P. L. A. M. An amplification-free hybridization-based DNA assay to detect *Streptococcus pneumoniae* utilizing the up-converting phosphor technology. **Clin. Biochem.**, v. 36, n. 5, p. 401-403, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa – **“Teste imunocromatográfico através da detecção do Antígeno Anódico Circulante para o diagnóstico de esquistossomose mansoni antes e após o tratamento em indivíduos de uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará”** – que tem por objetivo verificar a situação da Esquistossomose nos moradores da localidade de Bananeiras e avaliar um novo método diagnóstico, que usa urina e soro, para esta doença; Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento.

PROCEDIMENTOS: Se concordar em participar da pesquisa você terá que responder a um questionário com informações pessoais sobre a Esquistossomose e dados sobre a casa onde mora e sobre a renda da família. Serão realizadas coletas de sangue, fezes e urina após as entrevistas a fim de diagnosticar a doença.

RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS E COMO SÃO REALIZADOS: Entrevista não gravada (com informações pessoais e relativas à Esquistossomose); Coleta de 5,0 mL de sangue da veia do antebraço; As coletas serão realizadas nos postos de saúde pela equipe de pesquisa e equipamentos corretos, seguindo as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

RISCOS: Com a retirada de sangue podem ocorrer dores, inchaço e aparecimento de manchas roxas no braço. Caso ocorram essas situações você receberá atendimento de primeiros socorros.

BENEFÍCIOS: A participação nesse estudo poderá levar à descoberta da Esquistossomose, antes mesmo dela aparecer. Assim, esse estudo ajudará o paciente a tratar a doença o mais cedo possível, diminuindo as chances da evolução da doença para as formas graves que atingem o fígado e o intestino.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA As informações obtidas serão analisadas em conjunto pelos pesquisadores, não sendo divulgado o nome de nenhum paciente; Os dados e o material coletado serão utilizados somente para essa pesquisa.

DIREITO SOBRE OS RESULTADOS DA PESQUISA: Todos os participantes serão informados sobre os resultados da pesquisa.

DESPEAS E COMPENSAÇÕES: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá pagamento ao paciente para participar da pesquisa.

“Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa

para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é Mariana Silva Sousa que pode ser encontrada no telefone: (85) 8722-9986

“Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFC – Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8344 – E-mail: comepe@ufc.br”

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do
paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

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

Assinatura do responsável pelo
estudo

Data / /

APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Teste imunocromatográfico através da detecção do Antígeno Anódico Circulante para o diagnóstico de esquistossomose mansoni antes e após o tratamento em indivíduos de uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará”**. Seus pais permitiram que você participe. Queremos saber situação da Esquistossomose, doença transmitida por um caramujo que existe no rio da localidade de Bananeiras.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu não terá nenhum problema se desistir.

Se você concordar em participar da pesquisa, irá responder, com a ajuda dos seus pais, perguntas sobre a Esquistossomose e dados sobre a casa onde moram e sobre a renda da família. Você terá que realizar uma coleta de sangue após as entrevistas e entregar fezes e urina para que se faça exames nesses materiais também, para poder fazer o exame e ver se está doente ou não.

Com a retirada de sangue podem ocorrer um pouco de dor, devido à picada da agulha, inchaço e aparecimento de manchas roxas no braço, que passam logo.

Mas há coisas boas que podem acontecer como descobrir a doença antes mesmo dela aparecer. Assim, esse estudo ajudará a tratar a doença o mais cedo possível, diminuindo as chances de desenvolver a doença.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou perguntar à pesquisadora Mariana Silva Sousa. Eu escrevi os telefones na parte de baixo desse texto.

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“Teste imunocromatográfico através da detecção do Antígeno Anódico Circulante para o diagnóstico de esquistossomose mansoni antes e após o tratamento em indivíduos de uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará”**, que tem o objetivo saber situação da Esquistossomose nos moradores da localidade onde eu moro e avaliar um novo teste diagnóstico para essa doença utilizando urina e soro. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

“Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é Mariana Silva Sousa que pode ser encontrada no telefone: (85) 8722-9986.”

“Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFC – Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo

Teófilo; fone: 3366-8344 – E-mail: comepe@ufc.br”

Capistrano, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO SOCIOAMBIENTAL

Nº

_____, ____/____/____

1. IDENTIFICAÇÃO DO ENTREVISTADO

Peso _____ kg; Altura _____ ; Cinc. Abd: _____ cm; P.A. _____.

1.1. NOME: _____

1.2. DATA DE NASCIMENTO ____/____/____ IDADE _____ anos

1.3.

Sexo	Masculino	Feminino
	1	2

1.4.

Estado civil	solteiro(a)	casado(a)	divorciado(a)	viúvo(a)	outros
	1	2	3	4	5

Escolaridade	analfabeto(a)	fundamental incompleto	fundamental completo	médio incompleto	médio completo	superior incompleto	superior completo
	1	2	3	4	5	6	7

1.5. NATURALIDADE: _____ UF _____

1.6.

Zona	Urbana	Rural
	1	2

Área endêmica	Sim	Não
	1	2

2. SITUAÇÃO FINANCEIRA

2.1. PROFISSÃO _____

2.1.1. LUGAR ONDE EXERCE A PROFISSÃO:

Zona	Urbana	Rural
	1	2

2.2.

Chefe da família?	Sim	Não
	1	2

2.2.1. SE NÃO, QUAL O A PROFISSÃO DO CHEFE DA FAMÍLIA? _____

2.2.2. LUGAR ONDE EXERCE A PROFISSÃO:

Zona	Urbana	Rural
	1	2

2.3. PRINCIPAL RESPONSÁVEL PELO SUSTENTO FAMILIAR:

Pais e filhos	Pai	Mãe	Filho	Aposentado	O próprio	Outro
1	2	3	4	5	6	7

2.3.1 SE OUTRO, QUEM? _____

2.4.

Renda Familiar em Salários Mínimos	Menos de 1	Entre 1 e 3	Entre 3 e 5	Mais de 5
	1	2	3	4

2.5.

Ajuda do governo?	Sim	Não
	1	2

2.5.1. SE SIM, QUAL? _____

3. MORADIA

3.1.

Situação da moradia	Própria	Própria em pagamento	Cedida	Alugada	Invadida
	1	2	3	4	5

3.2. NÚMERO DE HABITANTES: _____

3.3. NÚMERO DE CÔMODOS : _____

3.4. NÚMEROS DE BANHEIROS: _____

3.5.

Tipo de construção	Alvenaria	Madeira	Taipa	Mista	Outro
	1	2	3	4	5

3.6.

Tipo de telhado	Telha	Palha	Lona	Zinco	Mista com palha	Mista sem palha	Outro
	1	2	3	4	5	6	7

4. CONDIÇÕES SANITÁRIAS

4.1.

Esgotamento Sanitário	Rede pública	Rua	Canal	Fossa vedada	Fossa não vedada
	1	2	3	4	5

4.2.

Destino do lixo	Coleta pública	Queima	Rio	Céu aberto	Enterrado	Queimado
	1	2	3	4	5	6

4.3.

Origem da água consumida	Rede pública	Cisterna	Poço	Vizinhança	Rio	Outro
	1	2	3	4	5	6

4.3.1. SE OUTRO, QUAL? _____

4.4. EM CASO DE FORNECIMENTO PÚBLICO:

Frequência	Diariamente	Dias alternados	1 vez na semana	Outro
		1	2	3

4.5.

Poço ou cisterna próximo a fossa?	Sim	Não
		1

4.6.

Tipo de Banheiro	Interno com água	Interno sem água	Externo com água	Externo sem água	Comunitário com água	Comunitário sem água	Não possui
		1	2	3	4	5	6

5. CONTATO COM ÁGUAS (COLEÇÕES HÍDRICAS):

5.1.

Tem contato?	Sim	Não
		1

5.2.

Motivos e frequências de contato									
Motivos			Frequência						
	Sim	Não	Diária	Semanal	Quinzenal	Mensal	Outro		
Buscar água	1	2	1	2	3	4	5		
Lavar louça	1	2	1	2	3	4	5		
Lavar roupa	1	2	1	2	3	4	5		
Tomar banho/higiene pessoal	1	2	1	2	3	4	5		
Nadar (lazer)	1	2	1	2	3	4	5		
Pescar	1	2	1	2	3	4	5		
Atravessar	1	2	1	2	3	4	5		
Regar horta	1	2	1	2	3	4	5		
Trabalho na lavoura	1	2	1	2	3	4	5		
Retirar areia	1	2	1	2	3	4	5		
Outros	1	2	1	2	3	4	5		

5.2.1. SE OUTROS, QUAL? _____

6. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Sim	Não
-----	-----

6.1. JÁ RECEBEU ALGUMA INFORMAÇÃO SOBRE ESQUISTOSSOMOSE, XISTOSE, BARRIGA D'ÁGUA?

1	2
---	---

6.1.1. SE SIM, ONDE? _____ HÁ QUANTO TEMPO? _____

6.2. DOS SINTOMAS AQUI COLOCADOS, INDIQUE QUAIS SÃO CAUSADOS PELA ESQUISTOSSOMOSE:

DIARRÉIA	FEBRE	QUEDA DE CABELO
DOR NA BARRIGA	MAL-ESTAR	CEGUEIRA
FEZES COM SANGUE	DIARRÉIA COM SANGUE	AUMENTO DE PRESSÃO
BARRIGA D'ÁGUA	AGITAÇÃO	DOR NOS OLHOS
AUMENTO DO FÍGADO	COMER TERRA	MUITA SEDE
COCEIRA NA PELE	DORES MUSCULARES	SUOR EM EXCESSO

6.3. EXPLIQUE COMO PEGA A DOENÇA.

Sim	1
Não	2
Parcialmente	3

6.4. VOCÊ JÁ TEVE ESQUISTOSSOMOSE?

Sim	Não
1	2

6.4.1. SE SIM, HÁ QUANTO TEMPO TEVE A DOENÇA? _____

6.4.2. APRESENTOU SINTOMAS?

Sim	Não
1	2

6.4.3.

Sinais e sintomas apresentados		
	Sim	Não
Febre	1	2
Diarréia	1	2
Dor abdominal	1	2
Problemas pulmonares (tosse)	1	2
Hepatoesplenomegalia discreta	1	2
Ascite (barriga d'água)	1	2
Fezes com sangue	1	2
Coceira na pele ou vermelhidão	1	2
Outros	1	2

6.4.3.1. SE OUTROS, QUAIS? _____

6.5. REALIZOU ALGUM EXAME PARA A DOENÇA?

Sim	Não
1	2

6.5.1. SE SIM, QUAL? _____

6.6. RECEBEU ALGUMA INFORMAÇÃO SOBRE O(S) EXAME(S) QUE SERIA/SERIAM FEITO(S)?

Sim	Não
1	2

7. TRATAMENTO

7.1. JÁ FOI TRATADO PARA ESQUISTOSSOMOSE?

Sim	Não
1	2

7.1.1. Quando?

1	DATA EXATA:
2	Menos de 1 ano
3	Entre 1 e 2 anos
4	Mais de 2 anos

Anexo 1 – Critérios do item 6.3 para indicar se o indivíduo sabe como ocorre a infecção da doença:

- Contato com a água;
- Presença do caramujo infectado.

Anexo 2 - Critérios usados para determinar o grau de contatos com as coleções hídricas:

VARIÁVEIS DE PONTOS ATRIBUÍDOS

1-

MOTIVO DE CONTATO	PONTOS
Tomar banho ou nadar	5
Lavar roupa	4
Regar horta, lavoura ou retirar areia	4
Buscar água e/ou lavar vasilhas	3
Lavar carro	3
Pescar ou atravessar o correço	2

2-

FREQUÊNCIA DE CONTATO	PONTOS
Diário	28
Semanal	4
Quinzenal	2
Mensal ou menos	1

3- NEGA CONTATOS: 0 pontos

ANEXO

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Teste imunocromatográfico para o diagnóstico de esquistossomose mansoni antes e após o tratamento em indivíduos de uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará.

Pesquisador: Marilena Silva Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22932713.7.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 480.719

Data da Relatoria: 05/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa para avaliar a acurácia de um novo método para o diagnóstico da Esquistossomose Mansonii, que utiliza urina e soro para pesquisa de antígeno anódico circulante (CAA), antes e depois de tratamento específico, em moradores de uma área de baixa endemicidade, na localidade de Bananeiras, município de Capistrano no Estado do Ceará, Brasil, tendo o método de Kato-Katz como parâmetro de comparação, assim como os resultados da técnica de PCR em tempo real para detecção de fragmentos de DNA de *S. mansoni* em amostras de fezes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avallar a acurácia de um método de diagnóstico imunocromatográfico para esquistossomose mansoni que detecta o CAA (Antígeno Anódico Circulante), em comparação com um método parasitológico e um molecular antes e após tratamento quimioterápico, em moradores de uma área de baixa endemicidade no Estado do Ceará - Brasil.

Objetivo Secundário:

1. Realizar o método imunocromatográfico para o diagnóstico do *S. mansoni*, na pesquisa de antígeno CAA no soro e na urina de moradores da

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Tedflio

CEP: 60.430-270

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comcep@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 480.719

comunidade em estudo; 2. Realizar o método parasitológico de Kato-Katz para o diagnóstico do *S. mansoni* na comunidade em estudo; 3. Realizar o método molecular da PCR em fezes para o diagnóstico do *S. mansoni* em moradores da comunidade em estudo; 4. Avaliar a acurácia do método de diagnóstico imunocromatográfico na pesquisa de antígeno CAA no soro e na urina em comparação com os outros métodos utilizados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para os sujeitos da pesquisa: Com a retirada de sangue podem ocorrer dores, inchaço e aparecimento de manchas roxas no braço. Caso ocorram essas situações o paciente receberá atendimento de primeiros socorros. Para os pesquisadores: há risco biológico nível 2 inerentes a execução da metodologia.

Benefícios:

Educação em saúde e diagnóstico da esquistossomose na população estudada, tratamento dos indivíduos positivos, e demonstração da acurácia de um novo método de diagnóstico para a esquistossomose mansoni para a comunidade científica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de muita relevância. O *S. mansoni* tem causado no Brasil um número expressivo de mortes em pessoas infectadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em conformidade

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3355-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comcep@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 480.719

FORTALEZA, 05 de Dezembro de 2013

Assinador por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Tedflio

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comapa@ufc.br