

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA
TRANSMISSÃO: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS (KATO-KATZ,
GRADIENTE SALÍNICO, PCR-ELISA e qPCR) ANTES E APÓS INTERVENÇÃO
TERAPÊUTICA**

por

Liliane Maria Vidal Siqueira

Belo Horizonte
Abril/ 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA
TRANSMISSÃO: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS (KATO-KATZ,
GRADIENTE SALÍNICO, PCR-ELISA e qPCR) ANTES E APÓS INTERVENÇÃO
TERAPÊUTICA**

por

Liliane Maria Vidal Siqueira

**Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Co-Orientação: Dr. Edward Oliveira

Belo Horizonte

Abril/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S619d Siqueira, Liliane Maria Vidal
2015

Diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa transmissão: Avaliação de diferentes técnicas (Kato-Katz, Gradiente Salínico, PCR-ELISA e qPCR), antes e após intervenção terapêutica / Liliane Maria Vidal Siqueira – Belo Horizonte, 2015.

XIX, 103 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 88 – 97

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/diagnóstico 2. Schistosoma mansoni/parasitologia 3. Doenças Endêmicas/prevenção & controle I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Oliveira, Edward José de

CDD – 22. ed. – 616.963

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM ÁREAS DE BAIXA
TRANSMISSÃO: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS (KATO-KATZ,
GRADIENTE SALÍNICO, PCR-ELISA e qPCR) ANTES E APÓS INTERVENÇÃO
TERAPÊUTICA**

Por

Liliane Maria Vidal Siqueira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dr. Sérgio Viana Peixoto

Prof. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Prof. Dra. Mariângela Carneiro

Prof. Dra. Hermínia Yohko Kanamura

Suplente: Prof. Dra. Soraya Torres Gaze Jangola

Tese defendida e aprovada em: 06/04/2015

Ao meu querido e amado filho, João Emanuel.

*Aos meus pais, Francisco e Izabel.
Agradeço pelos valores ensinados.*

“O maior tesouro que os pais podem deixar como herança para um filho é a educação. O conhecimento é um bem que jamais será tomado.”

AGRADECIMENTOS

Enfim é chegada a hora de agradecer. Foram quatro anos de muito aprendizado e de muitas parcerias, amizades que deixaram o caminho mais leve e que com certeza contribuíram para que eu chegasse até aqui fortalecida, amadurecida e principalmente muito agradecida.

Primeiramente agradeço a Deus, por ser luz no meu caminho e por tão perfeitamente conduzir minha vida! Obrigada Senhor!

Em segundo lugar ao meu porto seguro: Minha família! Refúgio para os momentos de aflições e incertezas e bálsamo nos momentos de alegria.

João Emanuel, meu filhinho. Três aninhos apenas e uma mãe que pelo seu trabalho se ausenta. Filho, você é minha razão de viver! À minha mãe, sempre presente apesar da distância física! Ao Thiago por ser um pai tão presente e por cuidar tão bem de nosso filho, nos momentos em que precisei me ausentar.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, que tornou possível a realização deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao meu orientador Dr. Paulo Marcos Zech Coelho. Não tenho palavras para agradecer por ser um orientador tão presente e acessível, além de ser compreensivo e humano. Suas qualidades vão além de ser um grande pesquisador, é exemplo! Sempre terei muito orgulho de ter sido sua aluna. Obrigada por todos os ensinamentos.

Ao meu co-orientador Dr. Edward Oliveira. Todas as vezes que precisei de seu auxílio, prontamente me atendia, dedicando sua atenção, contribuindo na minha formação, seja pela indicação da leitura de artigos científicos, discussão dos resultados de experimentos ou pela minuciosa correção de manuscritos. Sou muito grata pelos seus ensinamentos.

Ao Dr. Martin Johannes Enk, pelos ensinamentos durante o mestrado que se perpetuaram no doutorado, pela confiança e inclusão nas colaborações realizadas em estudos epidemiológicos do Instituto Evandro Chagas, no estado do Pará.

A Dra. Ana Rabello e a Dra. Luciana Gomes, pela colaboração firmada para a realização dos ensaios de biologia molecular PCR-ELISA e qPCR, pela revisão de manuscritos e pelo suporte científico.

À Carolina Senra e ao Eduardo Ribeiro pela valiosa ajuda na execução das técnicas e a todos do Laboratório de Pesquisas Clínicas pela receptividade.

Ao Dr. Naftale Katz, pela avaliação clínica dos pacientes das áreas endêmicas, pelas revisões de manuscritos, pela confiança e oportunidade cedida a mim. Dividir uma mesa redonda em um encontro científico ao seu lado foi para mim um privilégio! Obrigada por todos os seus ensinamentos!

Ao Áureo Almeida de Oliveira. Mais uma vez nossa parceria em trabalhos de campo foi consolidada. Você não mediu esforços para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigada!

À Nidia Francisca Figueiredo pelo apoio disponibilizado em Montes Claros. Aos técnicos do Centro de Controle de Zoonoses/Montes Claros pelo apoio nas áreas endêmicas.

À Vanessa Moraes, por ser companheira de trabalhos de campo e de viagens internacionais. Obrigada pelo carinho, compreensão e amizade.

À Flávia Couto, pela amizade, parceria em experimentos de avaliação de novos testes, bem como pela ajuda na realização das extrações para os ensaios de biologia molecular.

À Jussara Miranda, secretária querida, prestativa e sempre solícita em nos ajudar.

À D. Vera pelas revisões da língua inglesa nos manuscritos.

Ao Wander, pela amizade e por ter cedido minha primeira oportunidade em docência universitária, serei sempre muito grata!

Ana Carolina Mattos, pela amizade sincera e franca, que muito contribui para o meu crescimento e amadurecimento.

Ana Karine Sarvel, por ter cedido gentilmente as fichas clínicas epidemiológicas utilizadas e pela sua amizade.

À Dra Rafaella Fortini, pelas parcerias em trabalhos científicos e projetos.

À Dra Neusa Araújo pelo carinho de mãe e amizade!

Ao Dr. Élio Babá e a Dra Cristina Toscano pelo suporte científico no laboratório.

Eu teria um agradecimento especial a cada um de vocês amigos do LESQ. Agradeço a todos pela amizade e por terem tornado os meus dias mais agradáveis: Aristeu, Cintia, Clarice, Diana, Fábio, Gardênia, Mariana, Nathalie, Patrícia, Paty, Sueleny, Tati, Thais, Thiago, Vandinha, Viviane e Wagner.

Ao Dr Matheus Souza pela realização das análises de Bioinformática e construção das árvores de decisão diagnóstica.

Aos colegas da Pós-Graduação e aos amigos de outros laboratórios do CPqRR.

Ao Suporte Financeiro das Agências: CAPES (Bolsa de Doutorado), FIOCRUZ/CNPq através da Chamada MCT-CNPq/ FIOCRUZ Nº 03/2012 – PROEP/ Pesquisa Clínica e DECIT/CNPq pelo financiamento deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Epidemiologia da doença.....	23
3.2 Ciclo biológico.....	24
3.3 A doença.....	25
3.4 Controle.....	26
3.5 Tratamento Específico e Controle de Cura.....	27
3.6 Diagnóstico Laboratorial da Esquistossomose.....	28
3.6.1 Métodos parasitológicos.....	28
3.6.1.1 Técnica de Kato-Katz.....	29
3.6.1.2 Técnica do Gradiente Salínico.....	30
3.6.2 Métodos imunológicos.....	30
3.6.3 Métodos moleculares.....	32
3.6.3.1 PCR-ELISA.....	32
3.6.3.2 PCR em Tempo Real quantitativa– qPCR.....	33
4 JUSTIFICATIVA	34
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
6 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS	36
6.1 Fluxograma da Condução do Estudo.....	36
6.2 Área de estudo.....	36
6.3 População de Estudo.....	37
6.4 Coleta de amostras.....	37
6.5 Diagnóstico Laboratorial.....	37
6.5.1 Técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972).....	37

6.5.2	Técnica do Gradiente Salínico (Coelho et al., 2009)	38
6.5.3	Método Molecular	39
6.5.3.1	Ensaio de PCR-ELISA	39
6.5.3.2	Ensaio de qPCR (PCR em Tempo Real)	42
6.6	Tratamento e Controle de Cura	44
6.7	Fluxograma metodológico do Estudo	45
6.8	Intensidade de infecção	45
6.9	Análise estatística	46
6.10	Parâmetros utilizados na avaliação do desempenho diagnóstico das técnicas	47
7	RESULTADOS	48
7.1	Caracterização da População de Estudo	48
7.2	Resultados obtidos pelas diferentes técnicas na localidade Tabuas, Montes Claros	48
7.3	Técnica de Kato-Katz	48
7.3.1	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> com uma e duas lâminas de Kato-Katz	48
7.3.2	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando 24 lâminas de uma única amostra	49
7.3.3	Efeito do aumento do número de lâminas de uma única amostra na taxa de positividade da técnica de Kato-Katz na detecção da infecção com <i>S. mansoni</i>	50
7.4	Técnica do Gradiente Salínico	50
7.5	Prevalência da esquistossomose mansoni na população da localidade Tabuas	51
7.6	Taxa de positividade por faixa etária, gênero e localidade	51
7.6.1	Distribuição entre faixa etária e positividade da esquistossomose na localidade Tabuas	51
7.6.2	Distribuição dos participantes por gênero e taxa de positividade para esquistossomose na localidade Tabuas	52
7.6.3	Distribuição dos participantes por localidade e taxa de positividade para a esquistossomose mansoni na localidade Tabuas	53
7.7	Prevalência de outras parasitoses intestinais	53
7.7.1	Prevalência de helmintos e protozoários intestinais, pelas técnicas parasitológicas, na população da localidade Tabuas	53
7.8	Intensidade de infecção	54
7.9	Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico	55

7.9.1	Comparação entre os resultados das técnicas de Kato-Katz (2 lâminas) e Gradiente Salínico	55
7.9.2	Comparação do desempenho das técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico, utilizando-se 1000mg de fezes, na localidade de Tabuas	55
7.10	Diagnóstico Molecular – Técnica de PCR-ELISA	56
7.10.1	Avaliação comparativa entre as técnicas Kato-Katz (duas lâminas) e PCR-ELISA em relação à mesma amostra de fezes examinada	56
7.10.2	Avaliação comparativa entre a técnica de Kato-Katz e o ensaio de PCR-ELISA em relação à mesma quantidade de fezes examinada.....	56
7.10.3	Avaliação comparativa entre as técnicas Gradiente Salínico e PCR-ELISA em relação à mesma amostra de fezes examinada.....	57
7.11	Diagnóstico Molecular – Ensaio de qPCR.....	57
7.11.1	Avaliação comparativa entre a técnica de Kato-Katz e o ensaio de qPCR em relação à mesma quantidade de amostra de fezes examinada	58
7.11.2	Avaliação comparativa entre as técnicas Kato-Katz e qPCR em relação à mesma amostra de fezes examinada.....	58
7.11.3	Avaliação comparativa entre os resultados apresentados pela técnica do Gradiente Salínico e ensaio de qPCR em relação à mesma quantidade de amostra examinada.....	59
7.11.4	Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelos ensaios de PCR-ELISA e qPCR em relação à mesma quantidade de amostra examinada.....	60
7.12	Avaliação do desempenho das técnicas moleculares em relação ao Teste Referência, na localidade Tabuas	60
7.12.1	Avaliação comparativa entre PCR-ELISA (1000 mg) e Teste Referência..	60
7.12.2	Avaliação comparativa do desempenho do ensaio de qPCR (1000 mg) em relação ao Teste Referência	61
7.13	Concordância entre os métodos diagnósticos parasitológico e molecular.....	62
7.14	Síntese dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas diagnósticas aplicadas na população da localidade de Tabuas.....	63
7.15	Resultados obtidos pelas diferentes técnicas diagnósticas aplicadas na população da localidade de Estreito de Miralta.....	64
7.15.1	Técnica de Kato-Katz.....	64
7.15.1.1	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> com uma e duas lâminas de Kato-Katz	64

7.15.1.2	Avaliação da taxa de positividade para infecção por <i>S. mansoni</i> obtida pela análise de 24 lâminas de Kato-Katz.....	64
7.15.2	Efeito do aumento do número de lâminas de uma única amostra na taxa de positividade da técnica de Kato-Katz na detecção da infecção por <i>S. mansoni</i> na população da localidade de Estreito de Miralta.....	65
7.16	Técnica do Gradiente Salínico.....	65
7.17	Prevalência da esquistossomose na localidade Estreito de Miralta.....	66
7.18	Positividade por faixa etária, gênero e localidade.....	66
7.18.1	Distribuição entre faixa etária e taxa de positividade para a esquistossomose entre os participantes da localidade Estreito de Miralta.....	66
7.18.2	Distribuição entre gênero dos participantes e taxa de positividade para a esquistossomose na localidade Estreito de Miralta.....	67
7.18.3	Distribuição entre localidade e a taxa de positividade para a esquistossomose mansoni na localidade Estreito de Miralta.....	67
7.18.4	Prevalência de helmintos e protozoários intestinais, detectados pelas técnicas parasitológicas, na população da localidade Estreito de Miralta.....	68
7.19	Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico.....	68
7.19.1	Comparação entre as técnicas de Kato-Katz (2 lâminas) e Gradiente Salínico.....	68
7.19.2	Comparação entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico.....	69
7.20	Diagnóstico Molecular – Ensaio de qPCR.....	69
7.20.1	Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e qPCR utilizando a mesma amostra de fezes, na localidade Estreito de Miralta.....	70
7.20.2	Avaliação comparativa entre as técnicas de Kato-Katz e qPCR em relação à mesma quantidade de fezes examinada na localidade Estreito de Miralta.....	70
7.20.3	Avaliação comparativa entre as técnicas Gradiente Salínico e qPCR em relação à mesma amostra de fezes examinada na localidade Estreito de Miralta.....	71
7.20.4	Avaliação comparativa entre os resultados do ensaio de qPCR (1000 mg) e o Teste Referência.....	71
7.21	Concordância dos resultados apresentados pelos métodos diagnósticos parasitológico e molecular na localidade Estreito de Miralta.....	72

7.22	Síntese dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas na localidade de Estreito de Miralta	73
7.23	Intensidade de Infecção.....	73
7.24	Tratamento e avaliação clínica dos participantes positivos para esquistossomose mansoni nas duas localidades estudadas	74
7.25	Controle de cura dos indivíduos infectados e tratados na localidade Tabuas...	75
7.26	Controle de cura dos indivíduos infectados e tratados na localidade Estreito de Miralta.....	76
8	DISCUSSÃO	77
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
10	CONCLUSÕES	86
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
12	APÊNDICES	98
12.9	APÊNDICE A.....	98
12.10	APÊNDICE B	98
12.11	APÊNDICE C	99
12.12	APÊNDICE D	100
13	ANEXOS	101
13.9	Artigo 01: EVALUATION OF PARASITOLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES FOR DIAGNOSIS AND ASSESSMENT OF CURE OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI IN A LOW TRANSMISSION AREA.....	101
13.10	Check-list do guia de diretrizes STARD para estudos de avaliação de acurácia diagnóstica.....	108
13.11	Ficha Clínica e Epidemiológica aplicada aos participantes positivos para <i>S. mansoni</i> das localidades Tabuas e Estreito de Miralta	111
13.12	Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	116
13.13	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 2. Diagrama de Pert do estudo	36
Figura 3. Aparelho da técnica do Gradiente Salínico.....	39
Figura 4. Etapas da Amplificação / PCR-ELISA.	40
Figura 5. Etapas da Revelação/PCR-ELISA.	41
Figura 6. Determinação do <i>cut-off</i> para o ensaio de PCR-ELISA pela Curva ROC	42
Figura 7. Gráfico de amplificação no ensaio de qPCR e equipamento utilizado StepOne (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)	43
Figura 8. Critério de classificação do resultado no ensaio de qPCR.....	43
Figura 9. Fluxograma metodológico do estudo	45
Figura 10. Parâmetros utilizados na avaliação do desempenho de métodos diagnósticos.....	47
Figura 11. Árvore de decisão gerada para a localidade de Tabuas com base nos resultados de todas as técnicas diagnósticas aplicadas nas amostras de fezes de 148 indivíduos.....	87
Figura 12. Árvore de decisão gerada para a localidade de Estreito de Miralta com base nos resultados de todas as técnicas diagnósticas aplicadas nas amostras de fezes de 142 indivíduos.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de positividade obtida pela leitura de uma e duas lâminas da técnica de Kato-Katz, utilizando uma única amostra de fezes, na localidade Tabuas, Montes Claros (MG)....	49
Tabela 2. Taxa de positividade obtida pela leitura de 24 lâminas de Kato-Katz (1000mg).....	49
Tabela 3. Taxa de positividade obtida pela técnica do Gradiente Salínico	51
Tabela 4. Comparação entre as técnicas Kato-Katz (2 lâminas) e Gradiente Salínico	55
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico, utilizando-se 1000mg de fezes	56
Tabela 6. Comparação entre as técnicas PCR-ELISA e Kato-Katz (duas lâminas).....	56
Tabela 7. Comparação entre a técnica de Kato-Katz (24 lâminas) e o ensaio de PCR-ELISA utilizando 1000mg de fezes da mesma amostra de cada participante	57
Tabela 8. Comparação entre a técnica do Gradiente Salínico e o ensaio de PCR-ELISA utilizando 1000 mg de fezes da mesma amostra de cada participante	57
Tabela 9. Comparação entre a técnica de Kato-Katz (2 lâminas) e o ensaio de qPCR realizado em 1000 mg de fezes da mesma amostra	58
Tabela 10. Comparação entre os resultados obtidos pelo ensaio de qPCR e a técnica de Kato-Katz (24 lâminas).....	59
Tabela 11. Comparação entre os resultados obtidos pelo ensaio de qPCR e pela técnica do Gradiente Salínico	59
Tabela 12. Comparação dos resultados apresentados pelos ensaios de qPCR e PCR-ELISA .	60
Tabela 13. Comparação entre o ensaio de PCR-ELISA e o Teste Referência [Kato-Katz (24 lâminas) + Gradiente Salínico (1000 mg)]	60
Tabela 14. Parâmetros avaliados para a técnica de PCR-ELISA em relação ao Teste Referência.....	61
Tabela 15. Comparação entre o ensaio de qPCR e o Teste Referência [Kato-Katz (24 lâminas) + Gradiente Salínico (1000 mg)]	61
Tabela 16. Parâmetros avaliados para o ensaio de qPCR (1000 mg) em relação ao Teste Referência.....	62
Tabela 17. Concordância diagnóstica entre as diferentes técnicas empregadas para o diagnóstico da esquistossomose mansoni na população da localidade de Tabuas, Montes Claros, Minas Gerais	62
Tabela 18. Taxas de positividade obtidas pelas diferentes técnicas diagnósticas	63
Tabela 19. Taxa de positividade obtida pela leitura de uma e duas lâminas da técnica de Kato-Katz, utilizando uma única amostra de fezes, na localidade Estreito de Miralta	64

Tabela 20. Taxa de positividade obtida pela análise de 24 lâminas de Kato-Katz.....	64
Tabela 21. Comparação entre os resultados apresentados pelas técnicas do Gradiente Salínico e Kato-Katz (2 lâminas), aplicadas para o diagnóstico da esquistossomose mansoni na população da localidade de Estreito de Miralta.....	69
Tabela 22. Comparação dos resultados apresentados pelas técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico, aplicadas na população da localidade de Estreito de Miralta	69
Tabela 23. Comparação entre as técnicas Kato-Katz (2 lâminas) e qPCR (1000 mg) aplicadas em amostras da população da localidade de Estreito de Miralta.....	70
Tabela 24. Comparação entre o ensaio de qPCR e a técnica de Kato-Katz (24 lâminas)	70
Tabela 25. Comparação entre o ensaio de qPCR e a técnica do Gradiente Salínico.....	71
Tabela 26. Comparação entre o ensaio de qPCR e o Teste Referência [Kato-Katz (24 lâminas) + Gradiente Salínico (1000 mg)].....	71
Tabela 27. Parâmetros avaliados para a técnica de qPCR (1000 mg) em relação ao Teste Referência.....	72
Tabela 28. Concordância dos resultados apresentados pelos métodos de diagnóstico parasitológico e molecular aplicados na população da localidade de Estreito de Miralta	72
Tabela 29. Taxas de positividade obtidas pelas diferentes técnicas diagnósticas	73
Tabela 30 Monitoramento de cura 30, 90 e 180 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato-Katz, Gradiente Salínico, PCR-ELISA e qPCR.	75
Tabela 31 Monitoramento de cura 30, 90 e 180 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato-Katz, Gradiente Salínico e qPCR.	76
Tabela 32. Prevalência de helmintos intestinais entre os participantes da localidade Tabuas de acordo com as técnicas Kato-Katz e Gradiente Salínico.....	98
Tabela 33. Prevalência de helmintos intestinais entre os participantes da localidade Estreito de Miralta de acordo com as técnicas Kato-Katz e Gradiente Salínico	98
Tabela 34. Sintomas apresentados pelos participantes positivos da localidade Tabuas após avaliação clínica	99
Tabela 35. Sintomas apresentados pelos participantes positivos da localidade Estreito de Miralta após avaliação clínica	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Taxa de positividade acumulada decorrente do aumento de número das lâminas analisadas com uma única amostra.....	50
Gráfico 2. Comparação da proporção de indivíduos positivos pela técnica de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico em relação à faixa etária, na localidade Tabuas.....	52
Gráfico 3. Taxa de positividade para a esquistossomose por gênero na localidade Tabuas	52
Gráfico 4. Taxa de positividade para esquistossomose em Tabuas (sede) e na localidade Ribeirão de Tabuas (adjacente)	53
Gráfico 5. Intensidade de infecção por técnica parasitológica na localidade Tabuas	54
Gráfico 6. Taxa de positividade acumulada decorrente do aumento do número de lâminas examinadas pela técnica de Kato-Katz em uma única amostra, na localidade de Estreito de Miralta, Montes Claros, Minas Gerais.....	65
Gráfico 7. Comparação da proporção de indivíduos positivos pela técnica de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico em relação à faixa etária, na localidade Estreito de Miralta	66
Gráfico 8. Taxa de positividade para a esquistossomose por gênero na localidade Estreito de Miralta, Montes Claros, Minas Gerais.....	67
Gráfico 9. Taxa de positividade para esquistossomose em Estreito de Miralta (sede) e na localidade Serra Verde (adjacente).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

KK – Kato-Katz

GS – Gradiente Salínico

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

qPCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (PCR em Tempo Real quantitativa)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

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

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

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

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

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

TMB – Tetrametilbenzidina

SSC – Solução de Citrato de Sódio e Cloreto de sódio

PZQ – Praziquantel

WHO - *World Health Organization*

OMS - Organização Mundial de Saúde

SISPCE - Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

RESUMO

Este estudo populacional foi realizado em duas localidades endêmicas para a esquistossomose, Tabuas e Estreito de Miralta, pertencentes ao município de Montes Claros, região norte de Minas Gerais, empregando-se duas técnicas parasitológicas e dois ensaios moleculares para o diagnóstico da esquistossomose mansoni. Uma amostra fecal foi obtida de todos participantes e examinada utilizando a técnica de Kato-Katz (24 lâminas = 1000 mg) e a técnica do Gradiente Salínico, utilizando duas porções de 500 mg, totalizando 1000 mg de fezes. Além disso, os ensaios de PCR-ELISA e qPCR foram realizados em DNA extraído de 1000 mg de fezes. Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas foram analisados individualmente e comparativamente entre eles. Todos os indivíduos que apresentaram ovos de *Schistosoma mansoni* ou outros helmintos foram tratados com praziquantel ou albendazol, respectivamente. Para avaliação de cura após o tratamento, amostras de fezes dos indivíduos positivos para *S. mansoni*, foram coletadas 30, 90 e 180 dias após o tratamento, e examinadas pelas técnicas parasitológicas e pelos ensaios moleculares. Na localidade de Tabuas, a taxa de positividade, obtida pelo exame de duas lâminas pela técnica de Kato-Katz, foi de 15,5% (23/148), pela análise de 24 lâminas de Kato-Katz 20,9% (31/148) e a obtida pela técnica do Gradiente Salínico foi de 29,0% (43/148) ($p < 0,05$). A prevalência obtida pela combinação dos resultados das duas técnicas parasitológicas foi de 31,0% (46/148). O ensaio de PCR-ELISA apresentou taxa de positividade de 25,0% (37/148) e ensaio de qPCR, 30,4% (45/148). Na localidade Estreito de Miralta, a taxa de positividade obtida pelo exame de duas lâminas pela técnica de Kato-Katz foi de 10,5% (15/142). As técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e do Gradiente Salínico revelaram taxas de positividade de 19,7% (28/142) e 18,3% (26/142) ($p = 0,802$), respectivamente. A prevalência obtida pela combinação dos resultados das técnicas parasitológicas foi de 24,6% (35/142). O ensaio de qPCR apresentou taxa de positividade de 18,3% (26/142). Na localidade de Tabuas, as taxas de cura obtidas pelas técnicas parasitológicas Kato-Katz e Gradiente Salínico, 30, 90 e 180 dias após o tratamento foram 100%, 91,6% e 78,4%, respectivamente. Pelo ensaio de PCR-ELISA as taxas de cura obtidas foram de 89,7%, 88,8% e 67,5% e pelo ensaio de qPCR, as taxas de cura foram 100%, 83,3% e 62,1%, nas mesmas etapas de acompanhamento. Na localidade de Estreito de Miralta, as taxas de cura obtidas pelas técnicas de Kato-Katz e GS foram 93,3%, 96,9% e 96,5% (30, 90 e 180 dias após o tratamento, respectivamente) e pelo ensaio de qPCR foram 93,3%, 93,9% e 96,5% nas mesmas etapas de acompanhamento. Este estudo reforça a necessidade de se combinar técnicas com o objetivo de melhorar a acurácia diagnóstica, aumentando a chance de detectar indivíduos com carga parasitária baixa, reduzindo assim a contribuição destes para a manutenção da transmissão.

ABSTRACT

This populational study was conducted in two schistosomiasis endemic localities, Tabuas and Estreito de Miralta, municipality of Montes Claros, Minas Gerais state, using two parasitological techniques and two molecular assays for the diagnosis of schistosomiasis. One fecal sample was obtained from all participants and analyzed according to the Kato-Katz (KK) technique (24 slides = 1000 mg) and by Saline Gradient (SG) technique (using two portions of 500 mg, totalizing 1000 mg of feces). Moreover, the PCR-ELISA and qPCR assays were utilized for testing 1000 mg of feces. The results obtained by means of different techniques were individually analyzed and compared. All individuals who had *Schistosoma mansoni* eggs or other helminths were respectively treated with praziquantel or albendazol. For cure evaluation, samples of feces from individuals treated were collected 30, 90 and 180 days after treatment and examined by parasitological and molecular techniques. In Tabuas locality, the positivity rate obtained by the analysis of two and 24 KK slides were 15.5% (23/148) and 20.9% (31/148) respectively, both lower than that obtained by SG technique, 29.0% (43/148) ($p < 0.05$). The prevalence obtained by the combination of the parasitological techniques (KK + SG) was 31.0% (46/148). By the PCR-ELISA, the positivity rate was 25.0% (37/148), also lower than that obtained by the qPCR, 30.4% (45/148) ($p < 0.05$). In Estreito de Miralta locality, the SG and the qPCR showed the same positivity rate, 18.3% (26/142) and by the KK technique (24 slides) the positivity was 19.7% (28/142), no statistical difference was detected ($p = 0.802$). The prevalence obtained by the parasitological techniques (KK + SG) was 24.6% (35/142). The cure rates obtained by the KK and SG 30, 90 and 180 days after treatment, in the Tabuas locality, were 100%, 91.6% and 78.4%, respectively. By the PCR-ELISA assay, the cure rates were 89.7%, 88.8% e 67.5% and by the qPCR assay were 100%, 83.3% and 62.1% in the same followed-up steps. In Estreito de Miralta, the cure rates obtained by KK and SG were 93.3%, 96.9% e 96.5% (30, 90 and 180 after treatment, respectively) and by the qPCR the cure rates were 93.3%, 93.9% e 96.5% in the same followed-up steps. This study reinforces the need of combining techniques to improve the diagnosis accuracy, increasing from this way the detection of individuals with low parasite burden and for the cure assessment, as an important tool for disease transmission control.

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença que pode ser causada por seis espécies de *Schistosoma*, capazes de infectar o ser humano: *S. mansoni*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Davis 2009). *S. mansoni* é a única espécie transmitida nas Américas, sendo endêmica no Brasil, Venezuela, Suriname e Caribe, onde se estima que cerca de seis milhões de pessoas estejam infectadas, sendo a maioria residente no Brasil, e 25 milhões sob risco de infecção (WHO 2005). No Brasil, a doença tem distribuição heterogênea e a transmissão ocorre em uma vasta área endêmica, em 19 estados, existindo focos isolados no Distrito Federal, nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Relatos de casos importados de área endêmica são registrados em quase todo território nacional, principalmente em estados considerados pontos de migração como Rondônia (Coura e Amaral, 2004).

Com o surgimento de fármacos seguros e de fácil administração foi possível implementar um programa nacional para combater a doença e sua morbidade (Amaral et al. 2006). Durante os anos 70, a oxamniquina foi utilizada como fármaco de referência no controle quimioterápico da esquistossomose, sendo, posteriormente, substituído pelo praziquantel que passou a ser utilizado no tratamento em larga escala. Atualmente, os programas de controle empregados nas áreas endêmicas do Brasil se baseiam em quatro principais ações: o saneamento básico, a educação em saúde da população local, o diagnóstico individual e o tratamento dos indivíduos positivos para *S. mansoni*. Sendo assim, é de fundamental importância que o diagnóstico individual permita a identificação segura dos casos positivos, devendo os métodos diagnósticos empregados apresentarem alta sensibilidade, os quais devem fornecer ainda a real prevalência e serem capazes de identificar, com precisão, a cura clínica após intervenções terapêuticas (Berhe et al. 2004).

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis dividem-se em dois grupos, métodos diretos e métodos indiretos. Métodos diretos permitem a visualização ou detecção do parasito, através de ovos ou miracídios. Existem controvérsias a respeito da inclusão da detecção de antígenos circulantes e de material genético do parasito como métodos diretos, mas por outro lado, também estes não se enquadram entre os métodos indiretos. Permanece, portanto, a dicotomia de classificação, e nosso grupo defende que estes métodos sejam classificados como métodos intermediários, pois apesar de detectarem moléculas integrantes do parasito, existem muitas etapas no processamento dos testes impedindo que o diagnóstico seja feito de forma direta. Métodos indiretos demonstram a presença de anticorpos específicos em

amostras sorológicas do hospedeiro (Rabello 1990), traduzem, portanto, a resposta do hospedeiro frente à infecção. Métodos diretos se caracterizam como métodos de certeza diagnóstica. Porém, restrições na sensibilidade dos métodos diretos disponíveis geram a ocorrência de resultados falso-negativos, onde não é possível descartar a hipótese de infecção (Chieffi & Kanamura 1978).

A técnica de Kato-Katz é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1993) para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, sendo mundialmente utilizada pelo baixo custo, por quantificar a intensidade de infecção e por sua praticidade. Entretanto, esta técnica tem apresentado algumas limitações, especialmente na detecção de indivíduos que apresentem carga parasitária baixa. Além disso, possui baixa reprodutibilidade, quando se examina lâminas diferentes do mesmo indivíduo, apresenta leituras desiguais por examinadores diferentes e resultados falso-negativos, quando aplicada em amostras de fezes em fase anterior a ovoposição (Kongs et al. 2001; Berhe et al. 2004; Gentile et al. 2011). Outra limitação é a necessidade de diferentes amostras do mesmo paciente para que um resultado mais sensível seja alcançado, através da análise de múltiplas lâminas. Para estudos epidemiológicos, exames repetidos se tornam pouco práticos e economicamente inviáveis (Enk et al. 2008).

Resultados obtidos pelo nosso grupo demonstraram que a prevalência, determinada por meio da técnica de Kato-Katz, pela análise de uma ou duas lâminas, está significativamente subestimada, principalmente em áreas de baixa endemicidade para a esquistossomose mansoni (Enk et al. 2008; Siqueira et al., 2011). Esta situação contribui para falhas importantes nos programas de controle da doença (De Vlas & Gryssels 1992).

Conseqüentemente, nas áreas endêmicas do Brasil, onde a prevalência é baixa (geralmente menor que 10%) e para o diagnóstico de indivíduos com baixa carga parasitária, se faz necessário o uso de metodologias complementares para que o nível de sensibilidade do diagnóstico permita estimar a real prevalência (Barreto et al. 1990; Engels et al. 1996; Kongs et al. 2001; Enk et al. 2008; Siqueira et al. 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de técnicas parasitológicas e moleculares para o diagnóstico da esquistossomose mansoni e para o controle de cura, em áreas de baixa transmissão.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as técnicas Kato-Katz, Gradiente Salínico, PCR-ELISA (*in house*) e qPCR para o diagnóstico da esquistossomose mansoni e quanto ao monitoramento de cura pós-tratamento, na localidade Tabuas, município de Montes Claros, Minas Gerais;
- Avaliar as técnicas Kato-Katz, Gradiente Salínico e qPCR para o diagnóstico da esquistossomose mansoni e quanto ao monitoramento de cura pós-tratamento, na localidade Estreito de Miralta, município de Montes Claros, Minas Gerais;
- Determinar a prevalência da esquistossomose mansoni na população de Tabuas e Estreito de Miralta, considerando faixa etária, gênero e localidade;
- Determinar a co-positividade, co-negatividade e concordância diagnóstica entre as técnicas avaliadas nas diferentes áreas de baixa transmissão;
- Determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica das técnicas avaliadas nas diferentes áreas de baixa transmissão em relação ao Teste Referência;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia da doença

Nos países onde a esquistossomose é endêmica, atividades de controle são conduzidas a fim de se interromper a transmissão e/ou prevenir formas graves da doença, ou seja, são realizados o controle da transmissão e o controle da morbidade. Mundialmente, estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas estejam infectadas (WHO, 2015), enquanto 779 milhões estão sob risco de contrair a doença (Steinmann et al. 2006) e que 280.000 mortes por ano são atribuídas à esquistossomose e às complicações decorrentes principalmente de sua fase crônica (Van der Werf et al. 2003). Em torno de 72% dos indivíduos com esquistossomose vivem em 10 países da África (WHO, 2013), enquanto no Brasil tem sido estimado 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas (WHO, 2010). Programas de controle implementados poucas décadas atrás, apresentaram resultados variáveis, com completa erradicação em alguns países, tais como Japão e atual aumento da prevalência em outros, como em certas áreas da China (Zhou et al. 2007).

Apesar da disponibilidade de um tratamento oral em dose única de baixo custo, efetivo e com pouca toxicidade, somente 33,5 milhões receberam tratamento em 2010 (WHO, 2013). A carga parasitária baixa raramente está relacionada com morbidade grave. A mortalidade devido à doença é baixa (0,1% dos pacientes infectados), em todo o mundo. Dos quais 90% são habitantes da África sub-Saariana, onde a carga parasitária nos pacientes é frequentemente alta (Barsoum et al. 2013).

O “Global Burden of Disease Study 2010” (GBD 2010) indicou que a esquistossomose está como a 100ª causa de mortalidade no Brasil, e que as mortes, devido a esta doença, abrangem 3,6% do total estimado no mundo todo. *S. mansoni*, a única espécie com transmissão estabelecida no Brasil, ocorre em 19 estados e é considerada endêmica em nove destes. Áreas onde existe a transmissão da esquistossomose são geralmente caracterizadas por condições sociais e econômicas precárias (MS, 2012). Na maioria dos municípios do Brasil o risco de transmissão é considerado baixo e a transmissão poderia ser interrompida com medidas de controle reforçadas (WHO, 2010).

As atividades de controle no Brasil têm alcançado uma significativa redução nos indicadores de morbidade da infecção por *S. mansoni* (Amaral et al., 2006). Dois aspectos devem ser levados em consideração. Apesar do risco de transmissão ser baixo e a forma grave da doença em jovens ser rara, a perda de produtividade devido à forma grave ainda é um importante fator econômico na vida das famílias pobres que são acometidas pela doença (Nascimento & Oliveira, 2013).

Dentre as ações dos programas de controle são realizados inquéritos coproparasitológicos, com subsequente tratamento (atualmente com PZQ) dos indivíduos positivos na área investigada. Estas atividades são registradas no SISPCE (Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose) (MS, 1998). Em áreas não-endêmicas, a notificação no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) é compulsória. É recomendado que formas graves da doença sejam notificadas no SINAN independente da sua origem (MS, 2009).

No ano de 2010, foi dado início o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geohelmintoses no Brasil e até o presente momento a prevalência encontrada para esquistossomose é menor que 1%, cerca de 1,5 milhão de infectados [Naftale Katz (2014), dados apresentados em seminários de pesquisa]. Deve-se ressaltar que o inquérito foi realizado com o exame de apenas duas lâminas pela técnica de Kato-Katz, o que permite a inferência que o resultado final subestima a real prevalência da doença. Seria necessário, portanto métodos estatísticos para ajustar os valores de prevalência mais próximos da realidade.

3.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos vermes da espécie *S. mansoni* engloba uma fase sexuada no homem e uma fase assexuada em caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*. O ciclo inicia-se quando as fezes contaminadas, de um hospedeiro definitivo, um mamífero, sendo o mais importante o homem, atingem coleções hídricas, contendo o hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*. Os ovos eliminados juntamente com as fezes podem sobreviver de 2 a 5 dias em fezes de consistência sólida e 24 horas em fezes diarreicas. O contato com a água promove a dissolução das fezes e liberação dos ovos no meio líquido, provocando a eclosão e liberação das larvas ciliadas, os miracídios. Os miracídios nadam até encontrarem o caramujo, onde penetram através do tecido do mesmo; a partir desse ponto inicia-se a reprodução assexuada, transformam-se em esporocistos primários e por um processo de divisão por poliembrionia, em esporocistos secundários, gerando numerosas cercárias. As cercárias, liberadas pelos caramujos, nadam até encontrar o hospedeiro, onde penetram ativamente pela pele. O homem se infecta ao entrar em contato com águas contaminadas com estas formas larvais do parasito. A penetração da cercária na pele produz uma dermatite alérgica no local de entrada, podendo em alguns casos desenvolver um *rash* cutâneo. Durante a penetração na pele, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, os quais são transportados através dos vasos sanguíneos ou linfáticos para

o lado direito do coração e depois para os pulmões. Através da circulação sistêmica atingem as veias hepáticas, onde se desenvolvem em vermes adultos. Nas veias portais, os vermes adultos se acasalam, migram para veia mesentérica inferior, e a fêmea inicia a postura dos ovos de 4 a 6 semanas após a penetração cercariana. Aproximadamente 50% dos ovos são eliminados nas fezes. O restante fica retido na submucosa intestinal, podendo ser arrastados para várias partes do corpo. A resposta imune em torno do ovo produz uma reação granulomatosa, que é a principal responsável pela patologia da doença (Jenkins-Holick & Kaul, 2013) (Figura 1).

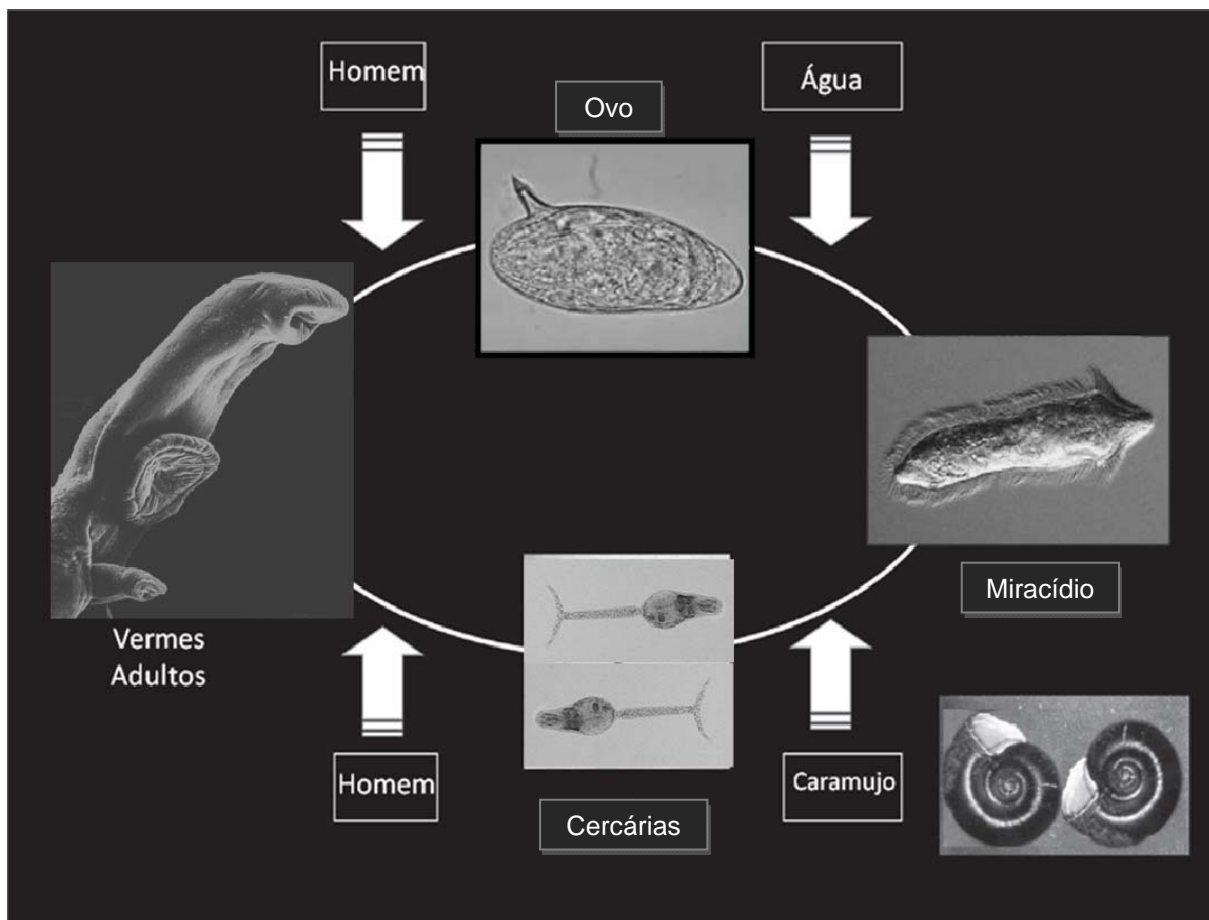


Figura 1. Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

Fonte: Adaptado de Barsoum et al. 2010

3.3 A doença

As manifestações clínicas da doença se dividem em fase aguda e fase crônica. A fase aguda coincide com a invasão e migração de esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro humano, seguido pelo início da ovoposição. Durante essa fase a resposta imune é inicialmente inata, seguida, poucos dias depois, por uma resposta imune adaptativa Th1-dominante.

A fase crônica da esquistossomose é caracterizada por uma mudança da resposta imune predominantemente Th1 pró-inflamatória para um perfil Th2 modulador gradualmente após várias semanas, coincidindo com a deposição de ovos, como resultado de mediadores humorais do parasito bem como do hospedeiro. Células inflamatórias são gradualmente eliminadas, sendo substituídas por fibroblastos, podendo ocorrer uma calcificação dos granulomas (Barsoum et al. 2013).

Considerando que indivíduos com cargas parasitárias altas têm maiores possibilidades de serem identificados pelo exame parasitológico de fezes e assim tratados, diminuindo a morbidade, a esquistossomose é uma doença com uma patologia ligada aos granulomas produzidos pelos ovos nos tecidos com lesões de efeito cumulativo. Entretanto, em certos casos mesmo com cargas parasitárias baixas, pode-se encontrar formas graves da doença, tal como a mielorradiculopatia esquistossomótica (formas ectópicas) (Lambertucci et al. 2007).

3.4 Controle

O programa de controle da esquistossomose tipicamente inclui duas abordagens: (a) controle da morbidade, que objetiva a redução do número de formas graves da doença; (b) controle da transmissão pela interrupção do ciclo evolutivo do parasito (Sarvel et al. 2011). Este último inclui saneamento básico, abastecimento de água potável, bem como limitação do acesso da população a coleções de água com caramujos infectados. Em geral, programas focados na erradicação de espécies de caramujos não resultam em completa erradicação destes moluscos, esta abordagem é difícil de ser sustentada, pois a repopulação das coleções hídricas pelos caramujos ocorre muito rapidamente.

Devido à indisponibilidade de uma vacina, o controle da doença depende primordialmente da quimioterapia. Segundo McManus & Loukas (2008), a proteção contra a esquistossomose poderia não somente reduzir a infecção e proteger contra a reinfecção, mas também acelerar a resposta imune em indivíduos infectados contra a patologia associada ao granuloma e/ou fecundidade das fêmeas. Porém este tipo de intervenção ainda se situa em um horizonte longínquo e, além disso, dispomos de um medicamento eficaz e seguro que até o presente momento é nossa principal ferramenta de combate ao parasito.

O Praziquantel (PZQ) é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma* e, é recomendado pela OMS para o tratamento da esquistossomose, tanto em nível populacional quanto individual. Tem se tornado o medicamento exclusivo devido ao seu baixo custo e eficácia contra formas adultas e atividade contra todas as espécies (Liu et al. 2013). Como parte da estratégia para realizar o tratamento em massa como ocorre nos Programas de

Quimioterapia Preventiva em países do exterior, para controle de morbidade causada pela infecção por *S. mansoni*, a Organização Mundial de Saúde recomenda o exame de duas lâminas de Kato-Katz de crianças em idade escolar, para estimar a prevalência local e mapear áreas para intervenção (WHO, 2006; WHO, 2010). O tratamento em massa é recomendado para áreas de alta prevalência (> 50%), enquanto a quimioterapia preventiva é recomendada para comunidades com prevalência moderada (10–49%) (Colley et al. 2013). Adolescentes e crianças tem sido o alvo destes programas, sendo este o grupo etário com elevada intensidade de infecção. Entretanto, há certas falhas e críticas a este tipo de intervenção, tais como dificuldades logísticas e financeiras e a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao medicamento.

Devido à extensão do programa de controle da doença no Brasil, tem ocorrido uma mudança nas características epidemiológicas da doença, paradoxalmente com ampliação das áreas de transmissão, mas com redução das taxas de prevalência. A interrupção da transmissão praticamente não ocorreu em áreas de maior extensão, embora em pequenos focos possa ter ocorrido, como por exemplo, em Esteio, no Rio Grande do Sul (Graeff-Teixeira et al. 1999).

3.5 Tratamento Específico e Controle de Cura

A presença de ovos nas fezes constitui indicação clínica fundamental ao tratamento. A positividade por técnicas imunológicas não autoriza a instituição do tratamento, pelo fato destas permanecerem positivas mesmo em pacientes curados, pois traduzem apenas a presença de anticorpos circulantes, não diferenciando entre infecção ativa de infecção passada (Cunha, 1992). Os níveis de antígenos circulantes do parasito declinam rapidamente com o tratamento efetivo, sendo a persistência destes antígenos, na ausência de ovos nas fezes, indicativo de uma infecção unissexuada, sem importância epidemiológica na transmissão, mas que confere imunidade ativa contra re-infecções (Barsoum et al. 2013).

A terapia específica leva a cura em cerca de 80% dos casos de esquistossomose e nos casos remanescentes não curados, a intensidade de infecção é significativamente reduzida (King, 2009). O critério de cura parasitológica é a ausência de ovos nos três meses subsequentes ao tratamento, o que indica que os vermes morreram. Já a presença de ovos viáveis nas fezes, indica postura de ovos pelo parasito, podendo ser explicada pela ineficácia da droga ou pelas reinfecções constantes a que estão expostos os indivíduos residentes em áreas endêmicas. Como a atividade da droga pode causar uma marcada redução na carga parasitária e uma interrupção temporária da postura dos ovos, a técnica de Kato-Katz torna-se

inadequada para detecção da infecção nestas situações, devido a sua baixa sensibilidade (Ferrari et al., 2003). A biópsia da mucosa retal pode demonstrar ovos mortos no tecido anos após o tratamento efetivo, mas por se tratar de um método invasivo e incômodo, o mesmo raramente é solicitado por clínicos, caindo, portanto em desuso.

3.6 Diagnóstico Laboratorial da Esquistossomose

3.6.1 Métodos parasitológicos

A demonstração direta do parasito – ovo ou miracídio – constitui método de diagnóstico de certeza. Porém, exames parasitológicos negativos não significam necessariamente que os indivíduos não estejam infectados (Chieffi & Kanamura, 1978). Este tem sido ainda hoje, um dilema encontrado no diagnóstico desta doença, pois quando se avalia a prevalência por meio de técnicas parasitológicas, pode-se ter uma ideia falsa da realidade, principalmente em áreas de baixa endemicidade, onde a maioria dos indivíduos são portadores de baixa carga parasitária. Nessas áreas, observa-se uma subestimação da prevalência real, com importantes consequências para o controle (De Vlas & Gryssels, 1992; Enk et al., 2008).

No diagnóstico pela biópsia retal, fragmentos são retirados da mucosa retal para detecção de ovos de *S. mansoni*, neste tecido. A quantificação de ovos por grama de tecido examinado recebe o nome de oograma. Esta técnica permite a avaliação da intensidade de infecção e é utilizada quando repetidos exames de fezes resultam negativos ou na avaliação de eficiência terapêutica. É uma técnica que exige a coleta de amostra por meio de um procedimento invasivo e bastante incômodo, realizado em ambiente hospitalar com pessoal especializado (Ferrari et al., 2003). Por isso, apesar de apresentar uma sensibilidade considerável, é totalmente inviável para trabalhos epidemiológicos.

A pesquisa de ovos em amostras de fezes tem diversas vantagens, dentre elas o baixo custo, a possibilidade de ser executada em laboratórios com infraestrutura básica, sendo o microscópio o equipamento mais sofisticado (Rabello, 1997).

As técnicas parasitológicas de fezes são divididas em qualitativas e quantitativas. As técnicas qualitativas detectam somente a presença de ovos do parasito nas fezes. A técnica de Lutz (1919), aperfeiçoada por Hoffmann, Pons e Janner (1934), também conhecida como Técnica da Sedimentação Espontânea, ou HPJ, é uma técnica qualitativa comumente aplicada na rotina laboratorial ou inquéritos coproparasitológicos, visto que possui baixa complexidade e baixo custo na execução. A técnica foi originalmente utilizada por Hoffmann e cols. no

diagnóstico da esquistossomose, mas atualmente tem sido amplamente utilizado no diagnóstico de outras helmintoses.

As técnicas quantitativas além de detectar a presença do *S. mansoni*, determinam o número de ovos ou miracídios presentes por grama de fezes. A técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972) e as técnicas de Eclosão de miracídios (Zicker et al., 1977; Jurberg et al., 2008), Gradiente Salínico (Coelho et al., 2009) e Helmintex (Teixeira et al., 2007) são consideradas quantitativas. Com exceção da técnica de Kato-Katz, as demais estão em processo de validação.

3.6.1.1 Técnica de Kato-Katz

A técnica de Kato & Miura (1954), tornou-se internacionalmente conhecida em 1966 e foi posteriormente modificada por Katz et al., 1972. Estes autores modificaram o método original simplificando a realização da técnica quantitativa, pela substituição da pesagem das fezes com balança por um cartão com um orifício central de 6 mm de diâmetro, definindo a quantidade de fezes a ser examinada (cerca de 42 mg). As lâminas confeccionadas podem ser mantidas em temperatura ambiente por vários meses, após a preparação, sem prejuízo dos resultados. Esta técnica é amplamente utilizada principalmente por seu baixo custo operacional e sua praticidade em situações de infraestrutura laboratorial precária (Rabello, 1997). Entretanto, em indivíduos com baixa carga parasitária, situações de baixa prevalência e após o tratamento específico, esta se torna menos sensível (Lin et al., 2008; Zhang et al., 2009; Ferrari et al., 2003; Enk et al., 2008).

As causas da baixa sensibilidade do diagnóstico coproscópico estão relacionadas em parte com a biologia do parasito e em parte com o hospedeiro. O parasito apresenta uma ovoposição de cerca 400 ovos/dia, dos quais somente metade é eliminada nas fezes, e o hospedeiro apresenta uma variação diária na eliminação dos ovos nas fezes. Considerando que a média de excreção fecal de um adulto é cerca de 200 g de fezes por dia, na menor carga parasitária possível, isto é, um casal de vermes, seria eliminado um ovo por grama de fezes. Como a técnica de Kato-Katz examina 41,7 mg de fezes, na situação mencionada a probabilidade de se detectar esta infecção seria de aproximadamente 1 em 24.

Estas limitações podem ser compensadas em parte com a utilização de maior quantidade do material a ser examinado (aumento do número de lâminas) ou coleta de mais de uma amostra por pessoa, dentro de pequenos intervalos de tempo. Entretanto, a coleta de várias amostras por pessoa pode aumentar consideravelmente os custos operacionais e dificultar a logística nos programas de controle (Teles et al., 2003, Enk et al., 2008).

A técnica de Kato-Katz apresenta outras limitações, dentre elas a impossibilidade de execução em amostras diarreicas, não detectar cistos de protozoários e larvas de helmintos, baixa reprodutibilidade entre amostras e entre lâminas diferentes de uma mesma amostra e entre leituras de examinadores diferentes (Kongs et al., 2001). Quando aplicada em uma única amostra de fezes, esta técnica é mais adequada para o controle de morbidade, mas menos adequada para o controle da transmissão (Engels et al., 1996).

3.6.1.2 Técnica do Gradiente Salínico

A técnica do Gradiente Salínico foi criada com o objetivo de desenvolver uma ferramenta simples e sensível para o diagnóstico da esquistossomose no campo.

O princípio desta técnica se baseia na propriedade dos ovos de *S. mansoni* sedimentarem em gradiente de concentração de solução de cloreto de sódio (solução salina). Dessa forma, uma quantidade (500 mg) de fezes é colocada sob um fluxo contínuo de solução salina a 3%, promovendo a suspensão e a retirada de detritos de baixa densidade da amostra fecal que está diluída em solução salina a 0,9% (este material menos denso corresponde a mais de 90% do total). Os ovos de *S. mansoni* possuem alta densidade e permanecem na superfície de uma placa porosa. O sedimento obtido é analisado ao microscópio óptico.

Trata-se de uma técnica de baixo custo, de execução fácil e rápida e que traz como grande vantagem, redução no número final de lâminas a serem examinadas e como consequência, redução do tempo de análise ao microscópio. Além disso, os ovos são mantidos com sua morfologia intacta e facilmente identificados, ao contrário do que ocorre com a técnica de Kato-Katz, que preserva apenas o contorno externo dos ovos.

Resultados preliminares demonstraram que esta técnica, examinando-se 500 mg de fezes, apresentou maior sensibilidade que 12 lâminas de Kato-Katz (12 x 41,7 mg ~ 500 mg) de uma única amostra fecal (Coelho et al. 2009).

3.6.2 Métodos imunológicos

Métodos imunológicos podem ser igualmente ferramentas valiosas na triagem de indivíduos positivos para a infecção por *S. mansoni* em inquéritos epidemiológicos (Turner et al. 2004; Gonçalves et al. 2006; Oliveira et al. 2008; Jin et al. 2010). Estas técnicas podem apresentar elevada sensibilidade, o que estimula sua utilização não somente para o diagnóstico de indivíduos de áreas endêmicas, mas também de turistas que retornam infectados para suas cidades, muitas vezes com altas cargas parasitárias (Doenhoff, Chiodini & Hamilton 2004) e que poderiam ser diagnosticados antes mesmo da postura de ovos.

Os ensaios para detecção de anticorpos e antígenos são estratégias promissoras complementares ao tradicional exame parasitológico. Embora eles sejam ensaios auxiliares, que podem ser usados para determinar resposta terapêutica e persistência da infecção, não são usados frequentemente em inquéritos populacionais devido ao fato de infraestrutura laboratorial ser requerida e a maioria dos testes estarem em processo de validação. Além disso, ensaios para detecção de anticorpos frequentemente não distinguem entre infecção ativa de infecção passada e ainda podem apresentar reação cruzada com outros helmintos. Quando estes ensaios são usados em áreas de baixa endemicidade, estratégias diagnósticas devem ser combinadas a fim de se obter uma melhor estimativa da taxa de infecção por *Schistosoma* spp. em populações em risco e para se avaliar a efetividade de medidas interventivas tal como o tratamento específico (Cavalcanti et al., 2013). Kanamura et al. (1998) relatam que a introdução de métodos sorológicos em estudos epidemiológicos, identificaria origens de infecção potencial, podendo contribuir para a redução da transmissão residual.

Dentre os testes imunológicos comercialmente disponíveis podem ser encontrados kits de ELISA e kits de reação hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti-*S. mansoni*. Recentemente, o teste POC-CCA[®] (*Point-of-Care*) para detecção de antígeno catódico circulante em amostras de urina (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul) foi avaliado e mostrou melhor sensibilidade que a técnica de Kato-Katz (Colley et al., 2013), entretanto, estudos multicêntricos de avaliação do desempenho deste teste ainda são necessários, especialmente em países com baixa endemicidade da doença.

Uma das dificuldades no desenvolvimento destes testes é a escolha de antígenos apropriados (Rabello et al. 2008). Resultados obtidos por nosso grupo comprovaram a superioridade de antígenos purificados em comparação aos antígenos brutos provenientes de vermes adultos (SWAP) ou de ovos (SEA) (Grenfell et al. 2013), uma vez que o uso de antígenos altamente purificados reduz a ocorrência de reações cruzadas com outros helmintos. O CCA (*Circulating Cathodic Antigen*) é um dos antígenos excretados/secretados pelo *S. mansoni* diretamente na circulação sanguínea do hospedeiro e serve como excelente marcador, uma vez que seus níveis se correlacionam diretamente com o número de vermes vivos no hospedeiro e estão presentes somente em infecções ativas, inclusive com vermes imaturos (Deelder et al. 1976; 1994; Polman et al. 1998). Entretanto, em situações de baixa intensidade de infecção, a maioria dos testes positivos ficam próximos do *cut-off* (ponto de corte), o que é uma desvantagem para sua aplicação em estudos epidemiológicos. Assim, a pesquisa de antígenos circulantes em áreas de baixa endemicidade deveria ser uma estratégia complementar e não um substituto ao exame parasitológico de fezes (Allam, 2012).

3.6.3 Métodos moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR), desde o seu surgimento em 1985 (Saiki et al. 1985), tornou-se uma nova ferramenta a ser considerada para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. A técnica permite a amplificação de sequências de DNA ou RNA do agente infeccioso, copiando-as em larga escala e de maneira bastante específica. A sua importância se faz sentir principalmente em infecções leves, nas quais uma técnica extremamente sensível é necessária para o diagnóstico preciso.

A PCR baseada na amplificação de sequências altamente repetitivas para detecção da infecção por *S. mansoni* em caramujos (Hamburger et al., 1991) foi adaptada para o diagnóstico da esquistossomose em fezes humanas por Pontes et al. (2002). No referido trabalho a técnica foi padronizada e avaliada em áreas endêmicas, sendo capaz de detectar 1 fg do DNA de *S. mansoni*. Reações de PCR já foram descritas por vários autores como ferramentas diagnósticas (Pontes et al. 2003; Gomes et al. 2006; Oliveira et al., 2010). Todas se mostraram eficientes na identificação dos casos positivos, mesmo em indivíduos portadores de baixa carga parasitária, e no correto diagnóstico dos casos negativos. Foram relatados pelos autores níveis de sensibilidade próximos a 90% e níveis de especificidade próximos a 100%. Hussein et al. (2012) identificaram DNA do parasito no soro de camundongos com apenas 3 dias de infecção, demonstrando que a PCR pode ser também aplicada para o diagnóstico precoce na fase pré-patente da infecção. Entretanto, Pontes et al. (2003) e Espírito-Santo et al. (2014) observaram uma sensibilidade mais baixa da PCR, realizada em soro humano, quando comparada à PCR realizada nas fezes, para a detecção de *S. mansoni*, utilizando a técnica de Kato-Katz como referência.

3.6.3.1 PCR-ELISA

Uma modificação na metodologia de detecção dos produtos amplificados pela PCR foi proposta para a detecção de DNA do parasito em amostras fecais, como uma alternativa ao diagnóstico de pacientes com baixa carga, denominada PCR-ELISA (Gomes et al. 2010). Esse sistema envolve a amplificação de uma região específica do DNA e a detecção do produto amplificado na PCR por um ensaio imunoenzimático de ponto final. Gomes et al. (2010) acharam 30% de positividade para infecção por *S. mansoni* pelo PCR-ELISA e somente 18% pelo exame parasitológico de fezes em uma população residente em área endêmica do Brasil. Ainda, a especificidade desse ensaio foi demonstrada pela ausência da amplificação de DNA de outros helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*,

Taenia solium e *Trichuris trichiura*), que comumente infectam indivíduos residentes em áreas endêmicas.

Dentre as principais vantagens do PCR-ELISA, está o fato de ser um ensaio semi-quantitativo com potencial para estimar a carga parasitária, que proporciona a detecção e interpretação objetiva dos resultados e permite o processamento de um maior número de amostras, em relação à eletroforese em gel de poliacrilamida. É indicado para aplicação em áreas de baixa endemicidade, onde a maioria dos indivíduos apresenta baixa carga parasitária, fato que restringe o uso da técnica de Kato-Katz, por apresentar sensibilidade limitada nessas situações. Desvantagens como a inibição da amplificação e ocorrência de contaminação foi monitorada pela inclusão de controle interno e controles negativos (não contendo DNA extraído) por cada dia de reação. Futuramente, esse ensaio poderá ser aplicado na avaliação de vacinas, de novas drogas terapêuticas e de focos de transmissão, bem como no monitoramento de cura após o tratamento específico.

3.6.3.2 PCR em Tempo Real quantitativa– qPCR

A técnica de PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR) é uma tecnologia de excelência no campo do diagnóstico molecular, devido sua capacidade de simultaneamente detectar e mensurar quantidades mínimas de ácidos nucleicos em uma gama de amostras das mais variadas origens. A robustez da técnica, associada à rapidez de execução, sensibilidade e especificidade obtidas em um ensaio, tornou-a uma ferramenta chave para a quantificação de ácidos nucleicos (Bustin et al. 2009).

Em estudo realizado por ten Hove et al. (2008) foi observado 100% de sensibilidade da qPCR para detecção de *S. mansoni* em indivíduos apresentando carga parasitária maior que 100 opg utilizando amostras de fezes, e uma associação significativa foi demonstrada entre excreção de ovos e o valor de Ct (*Cycle threshold* ou ciclo limite), representando a quantidade de DNA do parasito nas fezes. Segundo este mesmo autor, discrepâncias entre a microscopia e a técnica de qPCR são observadas em amostras com reduzida contagem de ovos nas fezes ou baixa concentração de DNA do parasito.

Um ensaio de qPCR para detecção e quantificação do DNA de *Schistosoma mansoni* em amostras de fezes foi desenvolvido pelo grupo do Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR e, avaliado como ferramenta potencial para o diagnóstico da esquistossomose mansoni. Iniciadores e sondas foram desenhados tendo como alvo o fragmento de 110 pb encontrado numa sequência altamente repetitiva de 121 pb do genoma de *S. mansoni* e o gene da β -actina humano foi utilizado como controle interno da reação. O ensaio desenvolvido trata-se, portanto de um ensaio de qPCR multiplex (manuscrito em preparação).

4 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o diagnóstico da esquistossomose tem sido realizado por técnicas parasitológicas diretas, as quais apresentam diversas vantagens, dentre elas o baixo custo, a possibilidade de serem executadas em laboratórios com infraestrutura básica e de não apresentar resultados falsos positivos. Entretanto, uma significativa redução da sensibilidade é observada quando aplicada em indivíduos residentes em áreas de baixa endemicidade, o que compromete a estimativa da prevalência real da doença. Essas limitações podem ser compensadas em parte com a utilização de maior volume do material fecal a ser examinado ou coleta de mais de uma amostra por pessoa, dentro de pequenos intervalos de tempo. A coleta de várias amostras por pessoa aumenta consideravelmente os custos operacionais e dificulta a logística do processo (Teles et al., 2003). Pesquisas visando o aprimoramento da metodologia em uso, em fase de validação ou em desenvolvimento, se tornam vitais frente à sensibilidade limitada das técnicas parasitológicas devido a baixas cargas parasitárias.

Para o controle da esquistossomose mansoni em áreas endêmicas ou em pequenos grupos populacionais, a prevalência estimada da infecção, o tamanho populacional, a disponibilidade de infraestrutura e recursos humanos e métodos diagnósticos com características intrínsecas, como sensibilidade e especificidade, pesam tanto na escolha do método como seu custo financeiro. Esperamos obter, com a avaliação das técnicas diagnósticas propostas neste estudo, o potencial para aplicação de cada uma em programas de controle da doença.

Com base no conceito de que, antes que um método seja aceito como de escolha para uma ação diagnóstica, ele primeiramente deve ser submetido à validação, esperamos promover com este trabalho a satisfatória avaliação de cada um dos novos e promissores métodos desenvolvidos. Métodos simples podem se mostrar suficientes para o controle da morbidade e de transmissão, especialmente importante em áreas e focos endêmicos. A utilização de um exame mais sensível representa o meio mais eficaz de diagnosticar indivíduos com baixa carga parasitária (realidade atual em nosso país) e que por isso são de difícil diagnóstico. A procura de técnicas mais sensíveis, mais específicas e de baixo custo deve ser uma meta fundamental das instituições públicas ligadas à saúde, que têm como missão apresentar ferramentas para auxiliar no controle e erradicação de doenças endêmicas.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado como continuidade de um projeto já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH 03/2008). Os objetivos do estudo foram apresentados e explicados a todos os participantes, e os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram individualmente assinados e armazenados.

6 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Fluxograma da Condução do Estudo

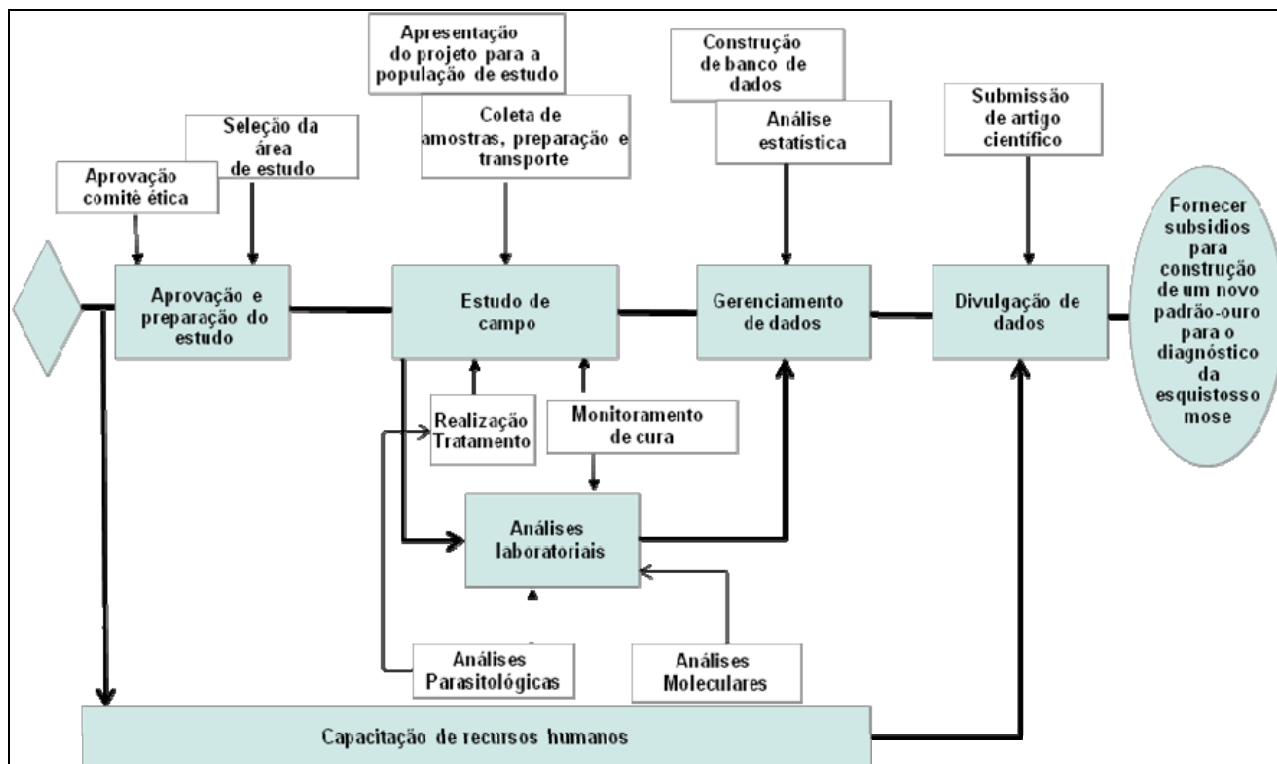


Figura 2. Diagrama de Pert do estudo

6.2 Área de estudo

O estudo foi realizado nas localidades Tabuas (no período de 2012 a 2013) e Estreito de Miralta (no período de 2013 a 2014), região endêmica para esquistossomose na zona rural do município de Montes Claros, norte do estado de Minas Gerais, situadas a aproximadamente 500 km de Belo Horizonte. A principal atividade exercida pela população destas áreas está ligada à agricultura e pecuária.

Estas áreas foram escolhidas pelo perfil da população, que não havia sido tratada para esquistossomose nos últimos dois anos e pelo baixo índice de migração (população residente fixa). A prevalência encontrada na localidade de Tabuas em 2010 foi 29,11% examinando-se duas lâminas de Kato-Katz por amostra, sendo a população trabalhada de 83 residentes do povoado, segundo registros do Centro de Controle de Zoonoses/Montes Claros. A localidade de Estreito não possuía dados de prevalência prévios, foi escolhida pelos mesmos critérios anteriores e pela sua proximidade com a localidade Tabuas. Estas localidades rurais são ainda subdivididas em comunidade sede e adjacente. Tabuas (sede) e Ribeirão de Tabuas (comunidade adjacente). Estreito de Miralta (sede) e Serra Verde (adjacente). Esta divisão foi feita a fim de se avaliar o perfil epidemiológico destes indivíduos segundo a procedência.

6.3 População de Estudo

Critérios de Inclusão: foram incluídos no estudo os moradores das localidades acima mencionadas, com idade superior a 01 ano, de ambos os sexos, que concordaram em participar do projeto e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. No caso dos indivíduos menores de idade, a autorização para a participação na pesquisa foi obtida, dos pais ou dos responsáveis pelas crianças.

Critérios de Exclusão: foram excluídos do estudo os indivíduos que não residiam nas localidades supracitadas, os menores de 01 ano de idade e aqueles que não concordaram em participar da pesquisa.

6.4 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de fezes na ocasião do inquérito epidemiológico inicial e no monitoramento de cura 30, 90 e 180 dias após o tratamento. Amostras de sangue e urina foram também coletadas para posterior realização de testes não contemplados neste estudo.

6.5 Diagnóstico Laboratorial

A amostra de fezes fornecida pelos participantes do estudo foi examinada pelas técnicas parasitológicas de Kato-Katz e do Gradiente Salínico nas duas localidades trabalhadas. Na localidade Tabuas, os ensaios moleculares PCR-ELISA e qPCR foram aplicados nesta amostra fecal e na localidade de Estreito de Miralta, além das técnicas parasitológicas, apenas o ensaio de qPCR foi realizado.

6.5.1 Técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972)

Esta técnica foi realizada utilizando o Helm-Test[®], produzido por Biomanguinhos/FIOCRUZ. A tela de nylon (com abertura de 150 µm) contida no kit foi colocada sobre as fezes, pressionando-as com o auxílio de uma espátula. Em seguida, as fezes filtradas foram transferidas para o orifício do cartão posicionado sobre uma lâmina. Após preencher completamente o orifício, o cartão foi retirado deixando as fezes sobre a lâmina de vidro. As fezes foram cobertas com lamínula de celofane semipermeável, previamente embebida em solução de verde-malaquita, e a lâmina foi invertida e pressionada contra o papel para a formação de uma camada delgada entre lâmina e lamínula. Essas preparações podem ser examinadas após duas horas ou até três meses, se devidamente acondicionadas, sem prejuízo dos resultados.

Para a execução da técnica de Kato-Katz, foram preparadas 24 lâminas da primeira amostra de cada indivíduo participante do estudo. Estas lâminas foram confeccionadas na área de estudo pelos técnicos do Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros/MG e enviadas ao Laboratório de Esquistossomose do CPqRR-FIOCRUZ, onde foram examinadas por meio de microscópio óptico, usando objetiva de 10x. Em média para confecção das 24 lâminas de Kato-Katz, o tempo gasto foi de 30 min por amostra. Para leitura microscópica, o tempo gasto em média foi de 50 minutos, realizada por um técnico experiente e treinado.

6.5.2 Técnica do Gradiente Salínico (Coelho et al., 2009)

As fezes foram filtradas em tela de nylon (Tegape, São Paulo, Brasil) apropriada com abertura de 150 μm e a quantificação do material foi realizada utilizando placa quantificadora de aço inox com orifício central com capacidade para 500 mg. Cada porção de 500 mg foi homogeneizada com 3 mL de solução salina a 0,85% e vertida na coluna de separação (g). Em seguida, um fluxo contínuo do sistema de gotejamento foi aberto (e) para que ocorresse a passagem da solução salina a 3% presente no reservatório principal (d) pela pastilha porosa presente na coluna. Esse fluxo contínuo (12 gotas por minuto) promove a suspensão dos detritos leves e seu posterior descarte (i). A placa porosa evita o turbilhonamento da suspensão (h) (Figura 3).

Os ovos de *S. mansoni*, por possuírem a propriedade de sedimentarem mesmo em solução salina altamente concentrada permanecem no fundo da coluna na superfície da placa porosa (Coelho et al., 2009). Após cerca de 20 minutos verifica-se a clarificação da suspensão e nítida separação do sedimento, o sistema foi fechado e todo material remanescente transferido para um tubo Falcon[®] (15 mL) e a este foi adicionada solução de formaldeído a 20% em proporção igual ao volume da suspensão (solução final formaldeído a 10%), para conservação do material até o momento da leitura microscópica. As lâminas foram preparadas com uma gota do sedimento e uma gota de solução salina e aposição de lamínula de vidro. A leitura foi realizada de forma quantitativa, ou seja, todo o material foi examinado. Em média para execução de 12 colunas simultaneamente, o tempo gasto foi de 40 min. Para leitura microscópica, o número de lâminas médio foi de 10 lâminas e o tempo gasto em média foi de 50 minutos, realizada por um técnico experiente e treinado.

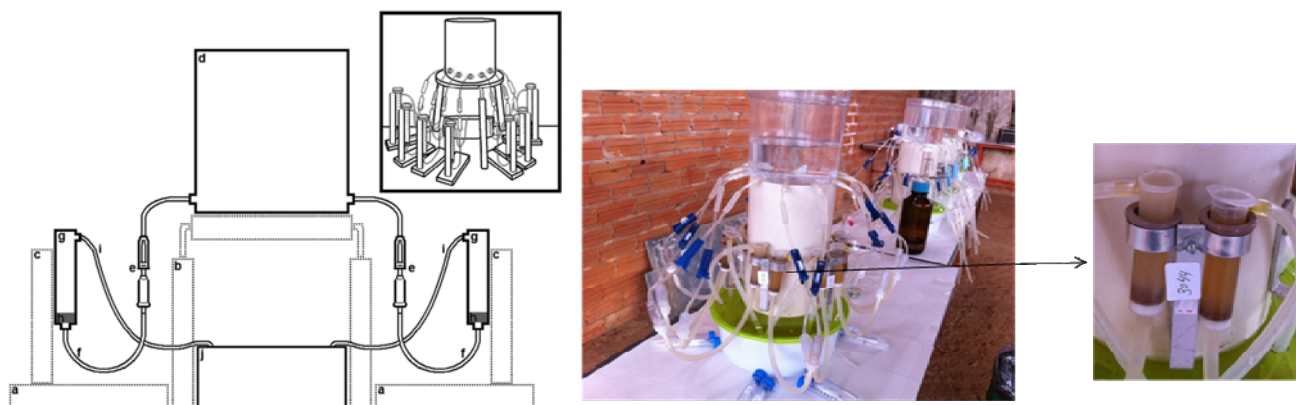


Figura 3. Aparelho da técnica do Gradiente Salínico

Fonte: Coelho et al., 2009 e do arquivo da autora

6.5.3 Método Molecular

6.5.3.1 Ensaio de PCR-ELISA

Esse ensaio foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Clínicas – CPqRR, chamado PCR-ELISA *in house* (Gomes et al., manuscrito em preparação). A quantidade de 1000 mg (2 porções de 500 mg) de amostra fecal foi mantida congelada (-20°C) até o momento de uso. O DNA das amostras fecais foi extraído usando o Kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante e seguindo os protocolos “DNA Isolation from Large Amounts of Stool” e “Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection”.

Na reação de PCR foram usados iniciadores senso marcado com biotina na extremidade 5’ (5’-GATCTGAATCCGACCAACCG-3’) e o anti-senso não marcado (5’-ATATTAACGCCACGCTCTC-3’), que amplificam um fragmento de 110 pb (Pontes et al. 2003) de uma sequência altamente repetitiva de 121 bp de *S. mansoni* (GenBank, número de acesso M61098) descrita por Hamburger et al. 1991, que compreende cerca de 10% do genoma do parasito. A reação de amplificação seguiu protocolo descrito por Gomes et al., 2010 e foi preparada para um volume final de 20 μL , contendo 2 μL de tampão da enzima GeneAmp 1X PCR Gold (Tris-HCl 150 mM, pH 8.0, KCl 500 mM), 2.0 U de AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 0,5 mM de cada primer, 1,5 mM de MgCl_2 e 0,2mM de dNTPs (Promega, Madison, WI, EUA) e 2 μL de amostra de DNA (diluída 5 vezes) em cada tubo. A amplificação foi conduzida em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Germany) programado com os seguintes ciclos: 15 ciclos a 95°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 30s, 12 ciclos a 80°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 30 s, 7 ciclos a 80°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 30s e uma etapa final de alongação a 72°C por 7 min (Figura 4).

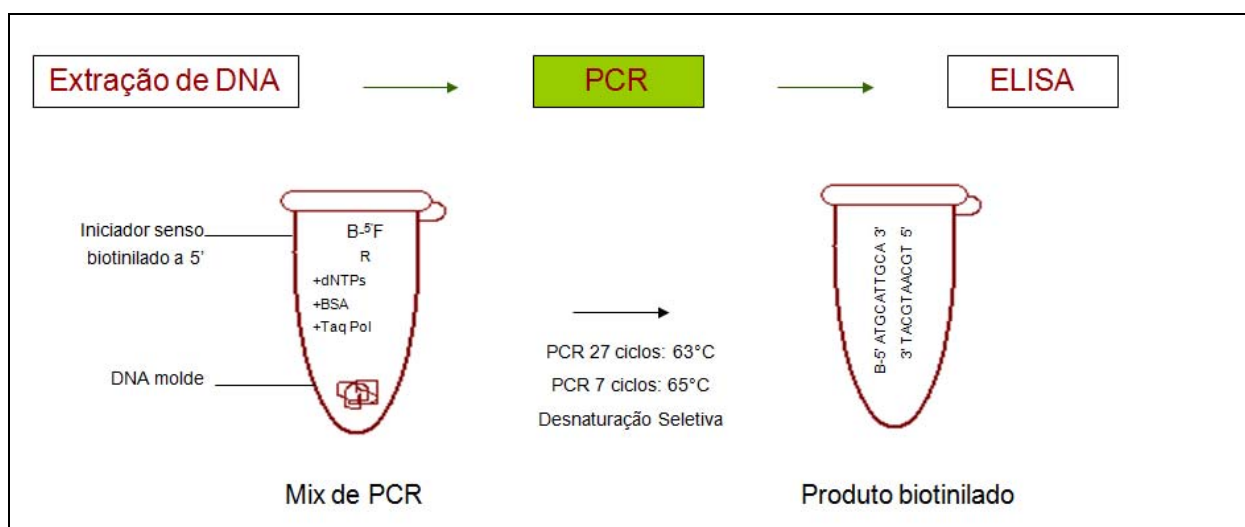


Figura 4. Etapas da Amplificação / PCR-ELISA. Fonte: Esquema gentilmente cedido pela Dra. Luciana Inácia Gomes.

- *Controle Interno da Reação* (β -actina): A reação de amplificação de uma sequência de 120 pb do gene humano *ACTB* codificador para β -actina foi realizada como controle interno da extração de DNA e amplificação. A reação foi preparada para um volume final de 20 μ L, contendo 2 μ L de amostra de DNA diluída em água na proporção 1:3, 2 unidades de *AmpliTaq Gold* DNA Polymerase (Applied Biosystems, New Jersey, Estados Unidos), 1X PCR Buffer (Tris-HCl 150 mM, pH 8.0, KCl 500 mM), iniciador senso Aco1: (5'-ACCTCATGAAGATCCTCACC-3') marcado com biotina na extremidade 5' e anti-senso Aco2: (5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3') (Musso *et al.*, 1996) a 0,5mM cada, 2,0 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs (Promega, Madison, WI, EUA) e BSA 0,1 μ g/ μ L. A amplificação foi conduzida a incubação inicial de 95°C por 12 min. e posteriormente a 35 ciclos: 95°C por 20 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. Uma etapa final de elongação a 72°C por 7 min. foi incluída. Em cada ensaio foi incluído um controle da PCR (mix da PCR sem o DNA).

- *Revelação do Ensaio*: Os produtos da amplificação foram revelados em microplacas de poliestireno MaxiSorp® (ThermoScientific Nunc, Vernon Hills, IL, EUA) sensibilizadas com estreptoavidina (Streptoavidin from *Streptomyces avidinii*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 5 μ g/mL seguindo o protocolo "PCR-ELISA *in-house*". As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por uma hora e seguindo por outra incubação em geladeira (2 a 8°C) overnight. Após este período, os orifícios foram lavados quatro vezes com 400 μ L de Tampão Salina-Fosfato contendo Tween 0,05% (TSF-T) e incubados com 200 μ L de solução TSF-T, contendo 3% de soro albumina bovina (BSA) a 37°C, por duas horas. Após bloqueio das placas, as amostras foram diluídas 1:20 em TSF e 100 μ L foram aplicados, em

duplicatas, nos orifícios da microplaca, que foi incubada por 30 min em câmara úmida a 37°C. As microplacas foram lavadas três vezes com 300 µL de TSF T-0,05% e adicionados 100 µL de solução de desnaturação (NaOH 0,1 M), incubando por 10 min em câmara úmida. Em seguida, as microplacas foram lavadas uma vez com 300 µL/orifício de NaOH 0,1 M e três vezes com Tris-HCl 0,1 M e foram adicionados 200 µL da sonda (FAM-5'-TGGTTTCGGAGATAACAACGA-3') diluída na concentração 0,4 pM em tampão de hibridização, incubando-se por 60 min em câmara úmida a 37°C. Após esta etapa, as microplacas foram lavadas três vezes com solução SSC 6X (NaCl 0,9M e citrato de sódio 0,09M) e duas vezes com a solução SSC 3X (NaCl 0,45M e citrato de sódio 0,045M) acrescida de 0,1% SDS e foram adicionados 150 µL de solução de BSA 1% em TSF, incubando em câmara úmida a 37° C por 30 min. Em seguida, foram acrescentados 150 µL de conjugado anti-fluoresceína marcado com peroxidase na diluição 1:5000 (Invitrogen, CA, EUA) e as microplacas foram incubadas por 60 min em câmara úmida a 37°C. Após a incubação, as microplacas foram lavadas quatro vezes com 300 µL de TSF T-0,05% / orifício, e foram adicionados 100 µL/orifício de solução substrato-cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e as microplacas foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente sob abrigo da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de solução de ácido sulfúrico 3N e a leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm (Modelo 550, Bio-Rad Laboratories, Tokyo, JA) (Figura 5).

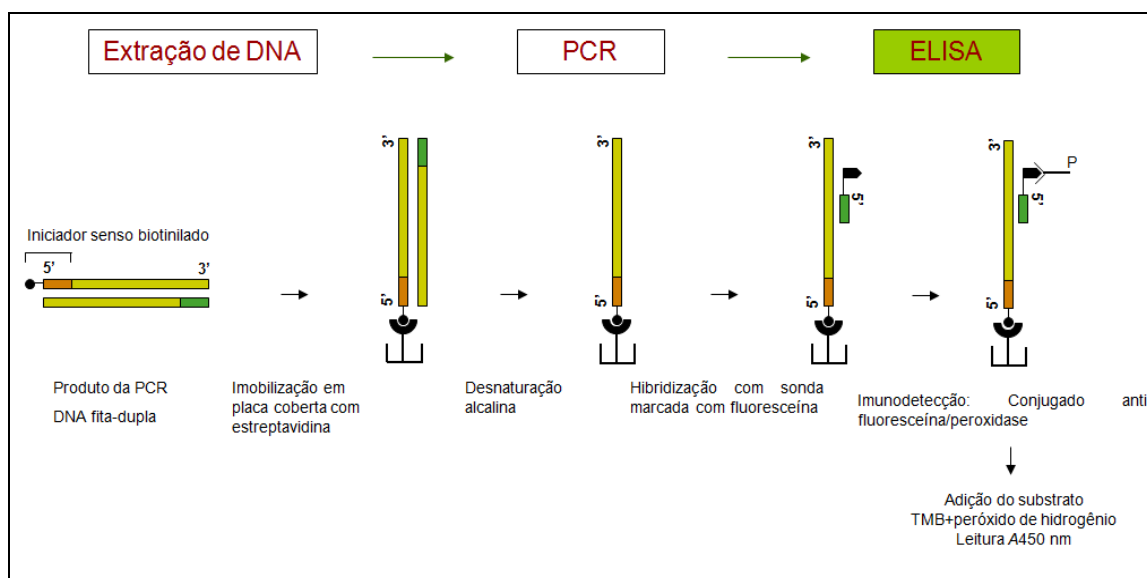
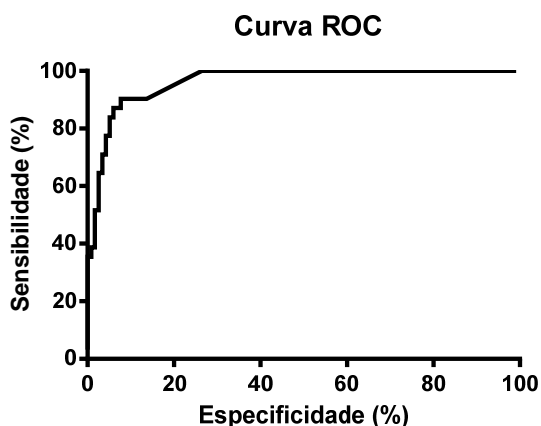


Figura 5. Etapas da Revelação/PCR-ELISA. Fonte: Esquema gentilmente cedido pela Dra. Luciana Inácia Gomes

Cada ensaio de PCR-ELISA foi realizado com controles positivos (DNA extraído de ovos de *S. mansoni*) e controles negativos (todos os reagentes sem o DNA). Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e os dados representam a média dos valores. O *cut-off* foi determinado pela curva ROC (*Receptor Operator Characteristic Curve*) e o valor obtido foi de 0,132 (Figura 6). Amostras que apresentaram a média das leituras de absorbâncias acima do *cut-off* foram consideradas positivas.



<i>Cut-off</i>	Sensibilidade %	IC 95%	Especificidade %	IC 95%	Likelihood ratio
> 0.0765	90,32	74.25% a 97.96%	91,45	84.84% a 95.83%	10,57
> 0.0830	90,32	74.25% a 97.96%	92,31	85.90% a 96.42%	11,74
> 0.0970	87,10	70.17% a 96.37%	92,31	85.90% a 96.42%	11,32
> 0.1160	87,10	70.17% a 96.37%	93,16	86.97% a 97.00%	12,74
> 0.1325	87,10	70.17% a 96.37%	94,02	88.06% a 97.56%	14,56
> 0.1410	83,87	66.27% a 94.55%	94,02	88.06% a 97.56%	14,02
> 0.0765	90,32	74.25% a 97.96%	91,45	84.84% a 95.83%	10,57

Figura 6. Determinação do *cut-off* para o ensaio de PCR-ELISA pela Curva ROC

6.5.3.2 Ensaio de qPCR (PCR em Tempo Real)

As amostras de DNA foram extraídas conforme descrito no ensaio de PCR-ELISA. As sequências dos iniciadores senso e anti-senso e a sonda 56-FAM (sequências não descritas - em processo de patente), específicos para *S. mansoni* e os iniciadores específicos para o gene da β -actina humana (*H.sapiens* ACTB) senso 5'-CCA TCT ACG AGG GGT ATG-3', anti-senso 3'-GGT GAG GAT CTT CAT GAG GTA-5', e a sonda 56-JOE/ CCT GCG TCT GGA CCT GGC TG/[3BHQ1] foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies - IDT (EUA) representada por Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil. A reação foi realizada com um volume final de 25 μ L contendo: 12,5 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2 \times (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), 1 μ L de iniciadores específicos para *S. mansoni* a 0,1 μ M, 0,625 μ L das sondas FAM e JOE a 0,25 μ M, 0,75 μ L de iniciadores específicos para β -actina a 0,15 μ M, 1,25 μ L de BSA 0,1 μ g/ μ L, 2 μ L MgCl₂ a

4 μ M, 0,5 μ L de água estéril e 4 μ L de DNA diluído 1:5 em água contendo acrilamida linear na proporção 994:6 (v/v). Para cada reação, dois controles foram usados: controle positivo (mix acrescido do DNA extraído de vermes adultos) e controle negativo da amplificação (NTC). A reação de amplificação foi conduzida no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), sob o programa de ciclagem universal, com 45 ciclos e temperatura de anelamento de 60°C.

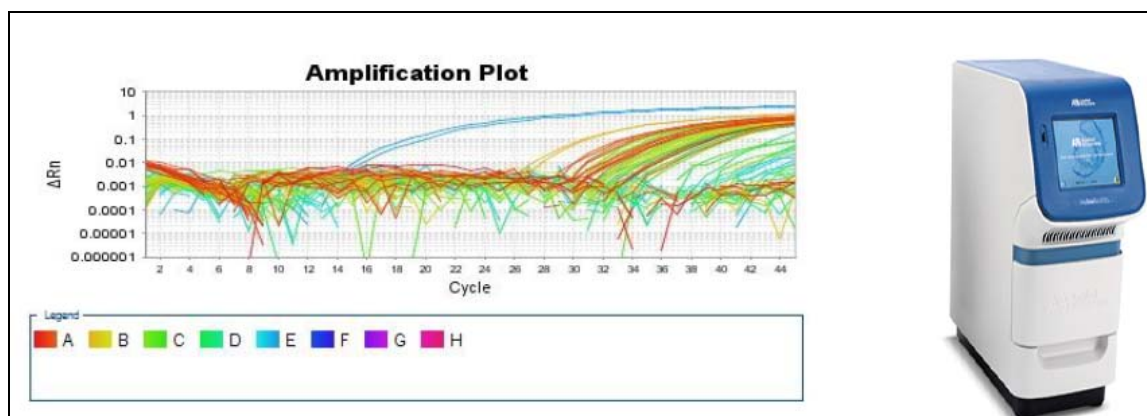


Figura 7. Gráfico de amplificação no ensaio de qPCR e equipamento utilizado StepOne (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA)

Para minimizar a possibilidade de contaminação, os protocolos de extração e amplificação foram realizados em salas diferentes. Todos os experimentos foram realizados em cabine de fluxo laminar, previamente irradiada com luz ultravioleta e empregando somente produtos descartáveis estéreis, incluindo ponteiras com barreiras. Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando placas vedadas com filme adesivo e o critério de classificação positivo/negativo está descrito na Figura 8.

Alvo	Ct (Cycle threshold)	Resultado
FAM (Schisto)	Indeterminado	Negativo
JOE (β -Actina)	< 42	
FAM (Schisto)	< 42	Positivo
JOE (β -Actina)	< 42	
FAM (Schisto)	Indeterminado	Inválido (repetir)
JOE (β -Actina)	Indeterminado	

Figura 8. Critério de classificação do resultado no ensaio de qPCR

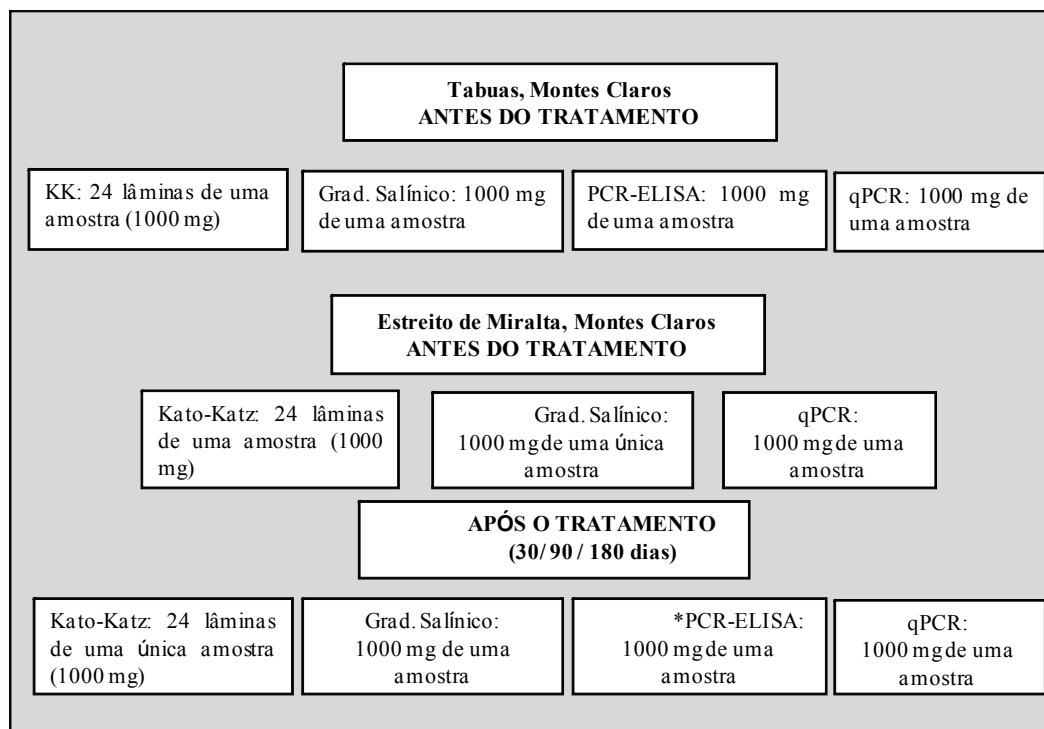
6.6 Tratamento e Controle de Cura

Todos os pacientes positivos para esquistossomose foram tratados com praziquantel na dosagem de 60mg/Kg para crianças e 50mg/Kg para adultos e os pacientes positivos para outros helmintos foram tratados com 400 mg de albendazol (dose oral única) como preconizado pelo Ministério da Saúde.

No momento do tratamento foi aplicada uma ficha clinica (ver anexo) pelo médico Dr. Naftale Katz e posteriormente realizou-se o tratamento, com a ingestão concomitante de um lanche e refresco, a fim de se aumentar a absorção do medicamento e minimizar os efeitos adversos oriundos da administração do mesmo.

O controle de cura foi realizado pela aplicação das técnicas de diagnóstico parasitológico e molecular nas amostras coletadas 30, 90 e 180 dias após o tratamento. Os indivíduos que apresentaram resultados positivos para esquistossomose e outros helmintos em cada etapa da reavaliação foram novamente tratados como descrito acima.

6.7 Fluxograma metodológico do Estudo



*PCR-ELISA não foi realizada na localidade Estreito de Miralta

Figura 9. Fluxograma metodológico do estudo

6.8 Intensidade de infecção

A intensidade de infecção individual foi determinada pelo número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes (opg). Para a técnica de Kato-Katz, a intensidade de infecção foi obtida pela média aritmética do número de ovos encontrado em cada lâmina, multiplicado pelo fator de correção 24, isto porque cada lâmina de KK tem capacidade para 41,7 mg ($41,7 \times 24 = 1000$ mg ou 1 grama). Para o Gradiente Salínico, o opg foi calculado multiplicando por 2 o número de ovos encontrados no sedimento total, isto porque o método utiliza 500 mg de fezes por tubo de separação.

A intensidade de infecção da população foi obtida pela média geométrica e pela mediana do número de ovos por grama de fezes (opg) dos indivíduos positivos para *S. mansoni* pelas duas técnicas parasitológicas.

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1993), existem três níveis de intensidade de infecção: (1) baixa intensidade: 1-100 opg, (2) moderada ou média: 101-400 opg e (3) alta: > 401 opg.

6.9 Análise estatística

Foi formulado um banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007. O Programa GraphPad Prism versão 4.0 foi utilizado para criação dos gráficos. As análises comparativas para avaliar o desempenho das técnicas diagnósticas (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e índice kappa) foram calculadas usando o Programa Open Epi versão 3.0. O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparações entre proporções. O nível de significância foi determinado com $p < 0,05$. O mesmo foi calculado no Programa EpiInfo versão 6.0 (Center for Disease Control and Prevention; Atlanta, GA, EUA). O teste McNemar foi utilizado para comparação entre as proporções de positividade obtidas pelas diferentes técnicas diagnósticas, calculado no Programa R. As taxas de co-positividade e co-negatividade entre as técnicas diagnósticas foram calculadas no Programa Open Epi versão 3.0 (Dean et al., 2014). O grau de concordância entre métodos de diagnóstico foi determinado pelo índice kappa.

Índice Kappa: A estatística kappa nos permite medir a concordância além do esperado por acaso. Segundo Landis e Koch (1977) a concordância entre métodos será *ruim* quando o índice kappa for menor que 0,20, *fraca* quando entre 0,21 - 0,40, *moderada* quando entre 0,41 - 0,60, *substancial* quando entre 0,61 - 0,80 e *excelente* quando maior que 0,81.

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

Taxa de Positividade: A taxa de positividade foi obtida pelo número de indivíduos positivos para *S. mansoni* por técnica ou por lâminas de Kato-Katz e combinações do número de lâminas dividido pelo total de participantes do estudo de cada localidade.

Teste Referência: Combinação dos resultados positivos para *S. mansoni* pelas duas técnicas parasitológicas [Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico (1000 mg)]. Este valor foi utilizado como referência para os demais cálculos na avaliação dos métodos diagnósticos do estudo (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e índice kappa).

6.10 Parâmetros utilizados na avaliação do desempenho diagnóstico das técnicas

Sensibilidade é a probabilidade de um teste ser positivo em um infectado ou doente, isto é, traduz a percentagem de infectados ou doentes corretamente diagnosticados por um teste positivo. A sensibilidade corresponde à proporção de verdadeiros positivos do teste: $a/(a+b)$.

Especificidade é a probabilidade de um teste ser negativo em um não infectado ou não doente, isto é, traduz a percentagem de não doentes corretamente identificados por um teste negativo. A especificidade corresponde à proporção de verdadeiros negativos do teste: $d/(c+d)$.

Valor Preditivo Positivo (VPP) é a probabilidade de um indivíduo ter a doença quando o teste é positivo: $a/(a+c)$.

Valor Preditivo Negativo (VPN) é a probabilidade de um indivíduo não ter a doença quando o teste é negativo: $d/(b+d)$.

O Valor Preditivo é determinado pela sensibilidade, especificidade e pela prevalência da doença na população testada. Quanto mais sensível o teste, melhor seu valor preditivo negativo. Quanto mais específico o teste, melhor seu valor preditivo positivo.

Acurácia ou Precisão de Diagnóstico: é a capacidade do teste de classificar corretamente o maior número de indivíduos avaliados entre verdadeiramente doentes e saudáveis: $(a+d/a+b+c+d)$.

		Padrão Ouro	
		Positivo	Negativo
Teste	Positivo	a	c
	Negativo	b	d

Sensibilidade:	$\frac{a}{a+b}$	Especificidade:	$\frac{d}{c+d}$
Valor Preditivo Positivo:	$\frac{a}{a+c}$	Valor Preditivo Negativo:	$\frac{d}{b+d}$
Eficácia do Teste:	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$		

Figura 10. Parâmetros utilizados na avaliação do desempenho de métodos diagnósticos.

Fonte: Adaptado de Rabello, 1997

7 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados por localidade endêmica trabalhada e conforme o Fluxograma 5.4.4 descrito na seção de Material e Métodos. Os resultados apresentados sob a forma de um artigo científico são referentes à localidade de Pedra Preta, o qual foi publicado na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Anexo 11.1). Os resultados das localidades Tabuas e Estreito de Miralta serão apresentados a seguir.

7.1 Caracterização da População de Estudo

Em Tabuas, a população de estudo consistiu de 148 participantes (73 do gênero feminino e 75 do gênero masculino, de idade entre 01 e 86 anos). Destes 148 participantes, 96 eram moradores da sede da localidade de Tabuas e 52 eram moradores da localidade adjacente Ribeirão de Tabuas. Em Estreito de Miralta, a população de estudo envolveu 142 participantes (77 do gênero feminino e 65 do gênero masculino, de idade entre 01 e 86 anos). Destes 142 participantes, 96 eram moradores da sede da localidade de Estreito de Miralta (sede) e 46 eram moradores da localidade adjacente Serra Verde.

Este estudo envolveu toda a população das duas localidades trabalhadas, sendo, portanto, de base populacional (censitário). O índice de adesão que obtivemos, considerando toda a população, foi 84,5% (148/175) para Tabuas e 87,1% (142/163) para a localidade Estreito de Miralta. Os motivos da não-participação no estudo são enumerados a seguir: 1) recusa; 2) amostra biológica insuficiente, não possibilitando a análise por todas as técnicas e 3) motivos de saúde.

7.2 Resultados obtidos pelas diferentes técnicas na localidade Tabuas, Montes Claros

7.3 Técnica de Kato-Katz

7.3.1 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* com uma e duas lâminas de Kato-Katz

Duas lâminas de Kato-Katz (2L1A) de uma única amostra é o procedimento de rotina adotado pelos programas de controle da esquistossomose no Brasil e a metodologia utilizada pelo Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geohelminthoses (INPEG). Os resultados obtidos na leitura de uma única lâmina (41,7 mg de fezes/lâmina) foram também considerados, visto que esta é a metodologia diagnóstica para levantamento de casos no

Estado de Minas Gerais. A taxa de positividade obtida pela leitura de uma lâmina de Kato-Katz foi de 12,1% (18/148) e a taxa de positividade obtida pela análise de duas lâminas foi de 15,5% (23/148) (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de positividade obtida pela leitura de uma e duas lâminas da técnica de Kato-Katz, utilizando uma única amostra de fezes, na localidade Tabuas, Montes Claros (MG)

Resultado	KK 1L1A		KK 2L1A	
	N	%	N	%
Negativo	130	87,9	125	84,5
Positivo	18	12,1	23	15,5
Total	148	100	148	100

7.3.2 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* examinando 24 lâminas de uma única amostra

A fim de realizar uma comparação quantitativa entre os métodos parasitológicos e moleculares foi necessário normatizar a quantidade de fezes examinadas em cada técnica. Portanto, foram utilizadas 24 lâminas da mesma amostra de fezes, isto porque cada lâmina de Kato-Katz tem capacidade para uma quantidade de 41,7 mg (24 lâminas x 41,7 = 1000 mg de material fecal). A taxa de positividade obtida foi de 20,9% (31/148) (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de positividade obtida pela leitura de 24 lâminas de Kato-Katz (1000mg)

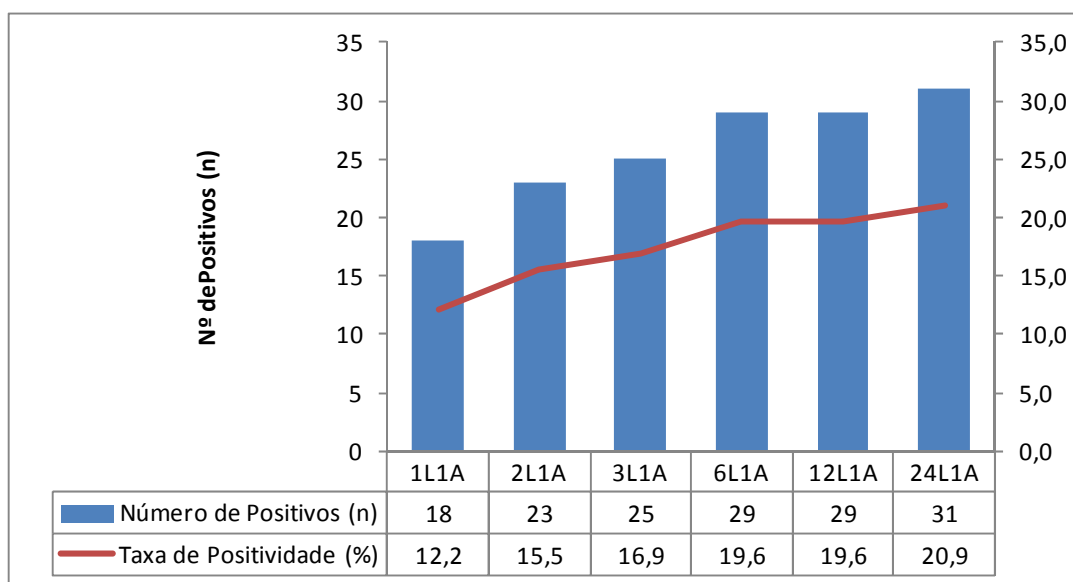
Resultado	KK 24L1A	
	N	%
Negativo	117	79,1
Positivo	31	20,9
Total	148	100

7.3.3 Efeito do aumento do número de lâminas de uma única amostra na taxa de positividade da técnica de Kato-Katz na detecção da infecção com *S. mansoni*

Os resultados obtidos pela técnica de Kato-Katz em uma lâmina, em três lâminas, em seis lâminas, em 12 lâminas e em 24 lâminas da mesma amostra foram avaliados. O efeito do aumento do número de lâminas é observado pelo aumento da taxa de positividade a cada lâmina adicional analisada.

Em uma lâmina de Kato-Katz da primeira amostra, 18 (12,2%) indivíduos foram positivos, 23 (15,5%) em duas lâminas, 25 (16,9%) em três, 29 (19,6%) em seis, 29 (19,6%) em 12 lâminas e 31 (20,9%) em 24 lâminas (Gráfico 1).

Gráfico 1. Taxa de positividade acumulada decorrente do aumento de número das lâminas analisadas com uma única amostra



7.4 Técnica do Gradiente Salínico

A técnica do Gradiente Salínico, utilizando duas porções de 500 mg cada que totaliza 1000 mg de fezes, detectou 43 participantes positivos para *S. mansoni*, indicando uma taxa de positividade de 29,0% (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de positividade obtida pela técnica do Gradiente Salínico

Resultado	Gradiente Salínico (1000mg)	
	N	%
Negativo	105	71,0
Positivo	43	29,0
Total	148	100

7.5 Prevalência da esquistossomose mansoni na população da localidade Tabuas

De acordo com os resultados obtidos pelas duas técnicas parasitológicas, examinando-se 24 lâminas pela técnica de Kato-Katz e 1000 mg pela técnica do Gradiente Salínico, foi detectada uma prevalência de 31,0%, sendo 46 positivos dos 148 participantes.

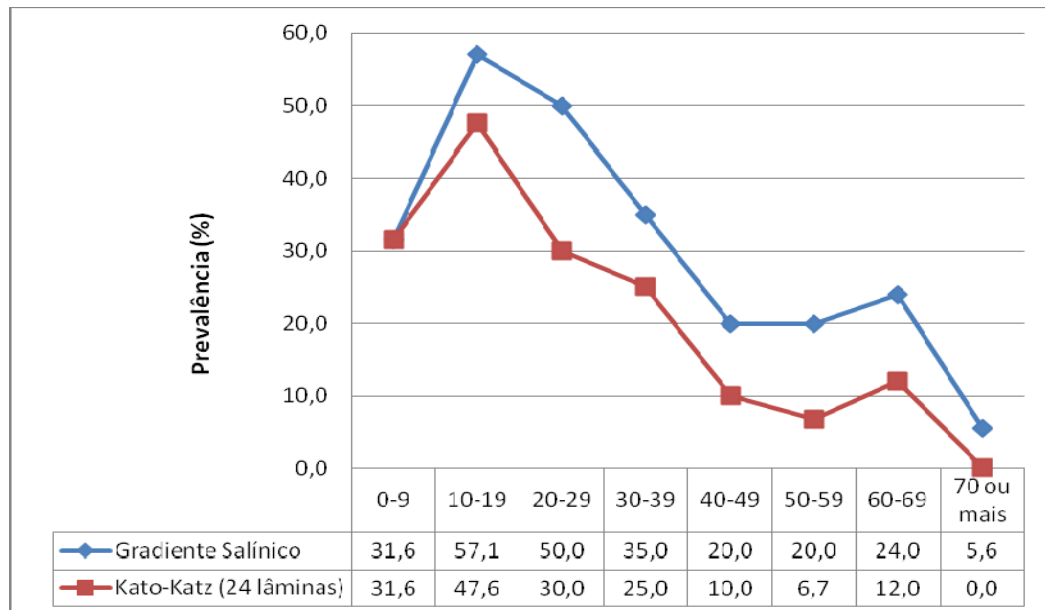
7.6 Taxa de positividade por faixa etária, gênero e localidade

7.6.1 Distribuição entre faixa etária e positividade da esquistossomose na localidade Tabuas

O Gráfico 2 ilustra a positividade da esquistossomose na localidade Tabuas (MG), determinada pelos resultados obtidos pelo exame de 24 lâminas de Kato-Katz e pela técnica Gradiente Salínico, estratificada por oito faixas etárias.

Na distribuição da esquistossomose por faixa etária observa-se a maior positividade pela técnica de Gradiente Salínico entre adolescentes de 10 a 19 anos (57,1%), seguido por jovens na faixa etária de 20 a 29 anos (50,0%). Esta tendência também é acompanhada pelos valores de positividade obtidos pela técnica de Kato-Katz.

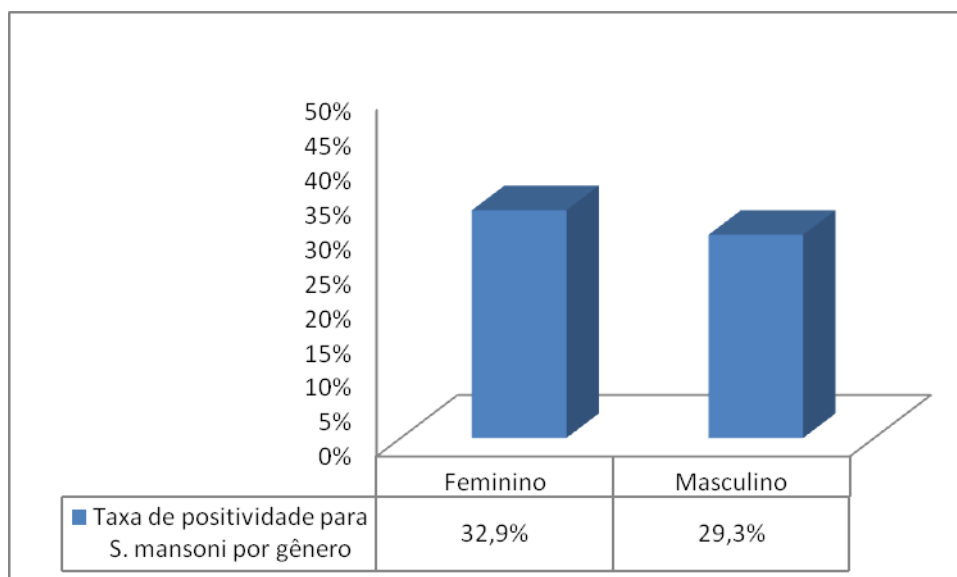
Gráfico 2. Comparação da proporção de indivíduos positivos pela técnica de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico em relação à faixa etária, na localidade Tabuas



7.6.2 Distribuição dos participantes por gênero e taxa de positividade para esquistossomose na localidade Tabuas

A população de estudo na localidade Tabuas era constituída por 148 participantes, 73 do gênero feminino e 75 do gênero masculino. Em relação à taxa de positividade da esquistossomose, 46 participantes foram positivos para *S. mansoni*, sendo 24 (32,9%) do gênero feminino e 22 (29,3%) do masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa da prevalência entre os gêneros ($p= 0,641$).

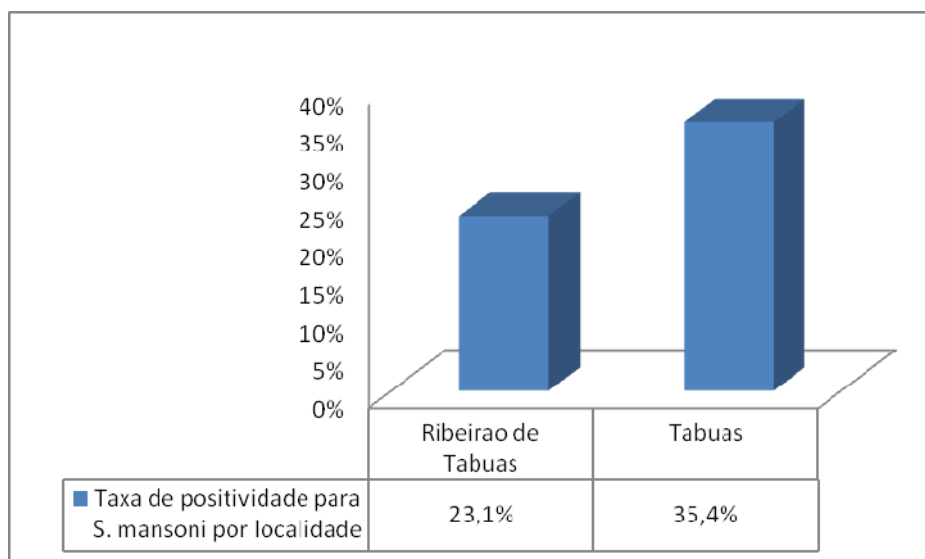
Gráfico 3. Taxa de positividade para a esquistossomose por gênero na localidade Tabuas



7.6.3 Distribuição dos participantes por localidade e taxa de positividade para a esquistossomose mansoni na localidade Tabuas

A sede da localidade Tabuas apresentou uma positividade de 35,4% (34/96) e a localidade de Ribeirão de Tabuas 23,1% (12/52). Não houve diferença estatisticamente significativa de prevalência entre as localidades ($p= 0,121$) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Taxa de positividade para esquistossomose em Tabuas (sede) e na localidade Ribeirão de Tabuas (adjacente)



7.7 Prevalência de outras parasitoses intestinais

7.7.1 Prevalência de helmintos e protozoários intestinais, pelas técnicas parasitológicas, na população da localidade Tabuas

Em relação aos demais helmintos, as duas técnicas em combinação detectaram 37 indivíduos positivos. A técnica de Kato-Katz detectou 16 (10,8%) positivos para ancilostomídeos, oito (5,4%) positivos para *Enterobius vermicularis*, oito (5,4%) positivos para *Ascaris lumbricoides* e dois (1,3%) positivos para *Trichuris trichiura*. Os demais helmintos não foram detectados. Dos participantes infectados com *S. mansoni* seis apresentaram co-infecção com ancilostomídeos e com *E. vermicularis*.

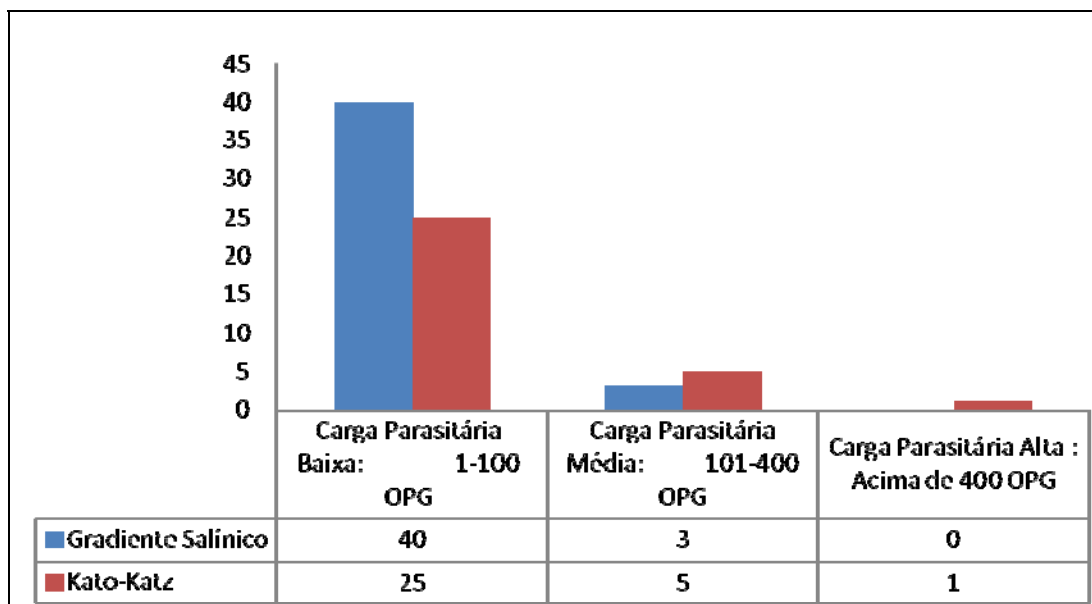
Pela técnica do Gradiente Salínico, dentre os 148 participantes, seis foram positivos para ancilostomídeos, cinco para *E. vermicularis*, dois para *A. lumbricoides*, dois para *Hymenolepis nana*. Em relação a protozoários intestinais, seis foram positivos para *Giardia* spp. e 20 foram positivos para *E. coli*, uma ameba não patogênica, porém sua presença é indicativa de má qualidade da água de consumo. Tabela 35 (Apêndice A, item 10.1).

7.8 Intensidade de infecção

A distribuição de participantes segundo a carga parasitária individual considerando as duas técnicas parasitológicas quantitativas aplicadas foi avaliada pelo número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes (opg). Na localidade Tabuas, pela técnica do Gradiente Salínico, dos 43 participantes positivos, 40 apresentavam carga parasitária baixa (entre 1 e 100 opg) e três apresentavam carga parasitária média (entre 100 e 400 opg). O método de Kato-Katz analisando 24 lâminas identificou 31 positivos, 26 com carga parasitária baixa (1-100 opg), cinco apresentando carga parasitária média (101-400 opg) e um com carga parasitária alta (>401 opg) (Gráfico 5).

A carga parasitária da população foi determinada pela média geométrica e pela mediana do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes. Pela técnica de Kato-Katz a média geométrica foi de 28,4 opg e a mediana 23 opg. Pela técnica do Gradiente Salínico a média geométrica foi de 5,6 opg e a mediana 4 opg.

Gráfico 5. Intensidade de infecção por técnica parasitológica na localidade Tabuas



7.9 Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico

7.9.1 Comparação entre os resultados das técnicas de Kato-Katz (2 lâminas) e Gradiente Salínico

Como já mencionado anteriormente, duas lâminas de Kato-Katz é a metodologia diagnóstica adotada pelos programas de controle da esquistossomose no Brasil. Os resultados obtidos pela leitura de duas lâminas (15,5%) pela técnica de Kato-Katz foram comparados com os obtidos com a técnica do Gradiente Salínico (29,0%) (Tabela 4). Estas proporções apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A co-positividade da técnica do Gradiente Salínico em relação à duas lâminas de Kato-Katz foi de 100% (IC 95%: 85,7 – 100) e a co-negatividade foi de 84,0% (IC 95%: 76,6 – 89,4).

Tabela 4. Comparação entre as técnicas Kato-Katz (2 lâminas) e Gradiente Salínico

		Kato-Katz (2 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
Gradiente Salínico (1000 mg)	Positivo	23	20	43
	Negativo	0	105	105
Total		23	125	148

7.9.2 Comparação do desempenho das técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico, utilizando-se 1000mg de fezes, na localidade de Tabuas

A comparação dos resultados apresentados pelas técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico revelou taxas de positividade de 20,9% e 29,0%, respectivamente. Estas proporções apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). As técnicas em combinação identificaram 46 indivíduos positivos (31,0% de positividade) (Tabela 5). A co-positividade da técnica do Gradiente Salínico foi de 90,3% (IC 95%: 75,1 – 96,6) e a co-negatividade de 87,2% (IC 95%: 79,9 – 92,0).

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico, utilizando-se 1000mg de fezes

		Kato-Katz (24 lâminas)		
		Positivo	Negativo	Total
Gradiente	Positivo	28	15	43
Salínico	Negativo	3	102	105
Total		31	117	148

7.10 Diagnóstico Molecular – Técnica de PCR-ELISA

A taxa de positividade obtida pelo ensaio de PCR-ELISA foi de 25,0%, ou seja, esta técnica detectou 37 indivíduos positivos para *S. mansoni* dentre os 148 indivíduos avaliados.

7.10.1 Avaliação comparativa entre as técnicas Kato-Katz (duas lâminas) e PCR-ELISA em relação à mesma amostra de fezes examinada

O ensaio de PCR-ELISA foi comparado com os resultados obtidos pela leitura de duas lâminas de Kato-Katz. A taxa de positividade obtida pelo ensaio de PCR-ELISA foi de 25,0% e pela técnica de Kato-Katz (duas lâminas) 15,5%. Estas proporções apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6). A co-positividade do PCR-ELISA foi de 91,3% (IC 95%: 73,2 – 97,5) e a co-negatividade de 87,2% (IC 95%: 80,2 – 91,9).

Tabela 6. Comparação entre as técnicas PCR-ELISA e Kato-Katz (duas lâminas)

		Kato-Katz (duas lâminas)		
		Positivo	Negativo	Total
PCR-ELISA	Positivo	21	16	37
	Negativo	2	109	111
Total		23	125	148

7.10.2 Avaliação comparativa entre a técnica de Kato-Katz e o ensaio de PCR-ELISA em relação à mesma quantidade de fezes examinada

O ensaio de PCR-ELISA foi comparado com 24 lâminas de Kato-Katz da mesma amostra que corresponde a 1000 mg de fezes (41,7 mg x 24 = 1000 mg). O PCR-ELISA detectou 37 (25%) indivíduos positivos para *S. mansoni*, enquanto que a técnica de Kato-Katz (24 lâminas) apresentou uma taxa de positividade de 20,9%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estas proporções ($p = 0,148$) (Tabela 7). A co-positividade

desta técnica em relação a 24 lâminas de Kato-Katz foi de 90,3% (IC 95%: 75,1- 96,6) e a co-negatividade de 92,3% (IC 95%: 86,0 – 95,9).

Tabela 7. Comparação entre a técnica de Kato-Katz (24 lâminas) e o ensaio de PCR-ELISA utilizando 1000mg de fezes da mesma amostra de cada participante

		Kato-Katz (24 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
PCR-ELISA (1000 mg)	Positivo	28	9	37
	Negativo	03	108	111
Total		31	117	148

7.10.3 Avaliação comparativa entre as técnicas Gradiente Salínico e PCR-ELISA em relação à mesma amostra de fezes examinada

O ensaio de PCR-ELISA foi comparado com a técnica do Gradiente Salínico utilizando a mesma quantidade de amostra fecal 1000 mg. A taxa de positividade do PCR-ELISA foi de 25,0% (37/148), já a técnica do Gradiente Salínico apresentou taxa de positividade de 29,0% ($p < 0,05$) (Tabela 8). A co-positividade do PCR-ELISA em relação à técnica do Gradiente Salínico foi de 76,7% (IC 95%: 62,2 - 86,8), apresentando uma co-negatividade de 96,2% (IC 95%: 90,6 - 98,5).

Tabela 8. Comparação entre a técnica do Gradiente Salínico e o ensaio de PCR-ELISA utilizando 1000 mg de fezes da mesma amostra de cada participante

		Gradiente Salínico (1000 mg)		Total
		Positivo	Negativo	
PCR-ELISA (1000mg)	Positivo	33	4	37
	Negativo	10	101	111
Total		43	105	148

7.11 Diagnóstico Molecular – Ensaio de qPCR

A taxa de positividade obtida pelo ensaio de qPCR foi de 30,4%, ou seja, foram detectados 45 participantes positivos para *S. mansoni* dentre os 148 indivíduos avaliados.

7.11.1 Avaliação comparativa entre a técnica de Kato-Katz e o ensaio de qPCR em relação à mesma quantidade de amostra de fezes examinada

Os resultados do ensaio de qPCR foram comparados com os resultados obtidos pela leitura de 2 lâminas de Kato-Katz. O qPCR detectou 45 indivíduos positivos para *S. mansoni* (30,4%), dentre estes 23 não foram detectados pelo exame de duas lâminas de Kato-Katz, e apenas um participante positivo pela técnica parasitológica não foi detectado pelo ensaio de qPCR. Houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de positividade obtidas por cada técnica ($p < 0,05$) (Tabela 9). A co-positividade do qPCR em relação à técnica de Kato-Katz (2 lâminas) foi de 95,6% (IC 95%: 79,0 – 99,2) e uma co-negatividade de 81,6% (IC 95%: 73,9 – 87,4).

Tabela 9. Comparação entre a técnica de Kato-Katz (2 lâminas) e o ensaio de qPCR realizado em 1000 mg de fezes da mesma amostra

		Kato-Katz (2 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	22	23	45
	Negativo	1	102	103
Total		23	125	148

7.11.2 Avaliação comparativa entre as técnicas Kato-Katz e qPCR em relação à mesma amostra de fezes examinada

O ensaio de qPCR foi comparado com o resultado obtido pela leitura de 24 lâminas de Kato-Katz da mesma amostra, o que corresponde a 1000 mg de fezes (41,7 mg x 24 = 1000 mg). O qPCR detectou 45 participantes positivos para *S. mansoni*, destes, 30 foram concordantes entre as duas técnicas e 15 foram positivos apenas pelo qPCR. A taxa de positividade obtida pelo qPCR foi de 30,4%, enquanto que a técnica de Kato-Katz (24 lâminas) apresentou uma taxa de positividade de 20,9%. Estas proporções apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 10). A co-positividade do qPCR em relação a 24 lâminas de Kato-Katz foi de 96,7% (IC 95%: 83,8 – 99,4) e uma co-negatividade de 87,2% (IC 95%: 79,9 – 92,0).

Tabela 10. Comparação entre os resultados obtidos pelo ensaio de qPCR e a técnica de Kato-Katz (24 lâminas)

		Kato-Katz (24 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	30	15	45
	Negativo	1	102	103
Total		31	117	148

7.11.3 Avaliação comparativa entre os resultados apresentados pela técnica do Gradiente Salínico e ensaio de qPCR em relação à mesma quantidade de amostra examinada

Os resultados obtidos pelo ensaio de qPCR foram comparados com os da técnica de Gradiente Salínico utilizando a mesma quantidade de amostra fecal 1000 mg. Dos 45 participantes que foram positivos pela qPCR, 10 não apresentaram resultados positivos pelo GS. A taxa de positividade da qPCR foi de 30,4% (45/148), já o Gradiente Salínico apresentou taxa de positividade de 29,0% (43/148). Não houve diferença estatisticamente significativa entre estas proporções ($p = 0,813$). A co-positividade do ensaio de qPCR em relação à técnica do Gradiente Salínico foi de 81,4% (IC 95%: 67,3 – 90,2) e uma co-negatividade de 90,4% (IC 95%: 83,3 – 94,7).

Tabela 11. Comparação entre os resultados obtidos pelo ensaio de qPCR e pela técnica do Gradiente Salínico

		Gradiente Salínico (1000 mg)		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	35	10	45
	Negativo	8	95	103
Total		43	105	148

7.11.4 Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelos ensaios de PCR-ELISA e qPCR em relação à mesma quantidade de amostra examinada

O ensaio de qPCR foi comparado com o ensaio de PCR-ELISA utilizando a mesma quantidade de amostra fecal (mesmo DNA extraído de 1000 mg de fezes). O qPCR detectou 45 (30,4%) amostras positivas, dentre estas, nove não foram detectadas pelo ensaio de PCR-ELISA, pelo qual foram detectados 37 amostras positivas (25,0%). Houve diferença estatisticamente significativa entre estas proporções ($p < 0,05$).

Tabela 12. Comparação dos resultados apresentados pelos ensaios de qPCR e PCR-ELISA

		qPCR (1000 mg)		Total
		Positivo	Negativo	
PCR-ELISA (1000 mg)	Positivo	36	1	37
	Negativo	9	102	103
Total		45	103	148

7.12 Avaliação do desempenho das técnicas moleculares em relação ao Teste Referência, na localidade Tabuas

7.12.1 Avaliação comparativa entre PCR-ELISA (1000 mg) e Teste Referência

Os resultados obtidos pelo ensaio de PCR-ELISA foram comparados com os obtidos pela combinação pelas duas técnicas parasitológicas, denominado neste trabalho como “Teste Referência”. O ensaio de PCR-ELISA detectou 37 positivos, destes apenas um não foi detectado pelo Teste Referência, o qual ainda detectou 10 casos a mais, que não foram detectados pelo PCR-ELISA (Tabela 13).

Tabela 13. Comparação entre o ensaio de PCR-ELISA e o Teste Referência [Kato-Katz (24 lâminas) + Gradiente Salínico (1000 mg)]

		Teste Referência		Total
		Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico (1000 mg)		
		Positivo	Negativo	
PCR-ELISA (1000 mg)	Positivo	36	1	37
	Negativo	10	101	111
Total		46	102	148

A sensibilidade do PCR-ELISA em relação ao Teste Referência foi de 78,2% apresentando uma especificidade de 99%, valor preditivo positivo de 97,3% e um valor preditivo negativo de 90,9% e uma acurácia diagnóstica de 92,5% (Tabela 14).

Tabela 14. Parâmetros avaliados para a técnica de PCR-ELISA em relação ao Teste Referência

Parâmetro	Taxa	IC 95%
Sensibilidade	78,2%	(64,4 – 87,7)
Especificidade	99,0%	(94,6 – 99,8)
Valor Preditivo Positivo	97,3%	(86,18, 99,52)
Valor Preditivo Negativo	90,9%	(84,2 – 95,0)
Acurácia	92,5%	(87,2 – 95,8)
Índice Kappa	0,816	(0,657 – 0,976)

7.12.2 Avaliação comparativa do desempenho do ensaio de qPCR (1000 mg) em relação ao Teste Referência

Os resultados do ensaio de qPCR foram comparados com os do Teste Referência. Foram detectados 45 indivíduos positivos para *S. mansoni* pelo qPCR, destes, sete não foram detectados pelo Teste Referência, e oito casos não foram detectados pelo qPCR (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação entre o ensaio de qPCR e o Teste Referência [Kato-Katz (24 lâminas) + Gradiente Salínico (1000 mg)]

		Teste Referência		Total
		Kato-Katz (24 lâminas) e		
		Gradiente Salínico (1000 mg)		
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	38	7	45
	Negativo	8	95	103
Total		46	102	148

A sensibilidade do ensaio de qPCR em relação ao Teste Referência foi de 82,6%, especificidade de 93,1%, valor preditivo positivo de 84,4%, valor preditivo negativo de 92,3% e uma acurácia diagnóstica de 89,8% (Tabela 16).

Tabela 16. Parâmetros avaliados para o ensaio de qPCR (1000 mg) em relação ao Teste Referência

Parâmetro	Taxa	IC 95%
Sensibilidade	82,6%	69,3 – 90,9
Especificidade	93,1%	86,5 – 96,6
Valor Preditivo Positivo	84,4%	71,2 – 92,2
Valor Preditivo Negativo	92,3%	85,4 - 96,0
Acurácia	89,8%	83,9 – 93,7
Kappa	0,762	0,600 – 0,923

7.13 Concordância entre os métodos diagnósticos parasitológico e molecular

Duas lâminas de Kato-Katz apresentaram uma concordância *substancial* com GS e PCR-ELISA (kappa= 0,620 e 0,628) e *moderada* com o ensaio de qPCR (kappa = 0,555). A técnica de Kato-Katz (24 lâminas) apresentou uma concordância *substancial* tanto em relação ao GS (kappa = 0,678), quanto em relação aos ensaios de PCR-ELISA (kappa = 0,771) e qPCR (kappa = 0,720). Os ensaios de qPCR e PCR-ELISA apresentaram concordância excelente (kappa = 0,832) (Tabela 17).

Tabela 17. Concordância diagnóstica entre as diferentes técnicas empregadas para o diagnóstico da esquistossomose mansoni na população da localidade de Tabuas, Montes Claros, Minas Gerais

Concordância / Índice kappa			
	Gradiente Salínico	qPCR	PCR-ELISA
Kato-Katz (2 lâminas)	Substancial / 0,620	Substancial / 0,555	Substancial / 0,628
Kato-Katz (24 lâminas)	Substancial / 0,678	Substancial / 0,720	Substancial / 0,771
PCR-ELISA (1000 mg)	Substancial / 0,760	Excelente / 0,832	--
qPCR (1000 mg)	Substancial / 0,709	--	

7.14 Síntese dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas diagnósticas aplicadas na população da localidade de Tabuas

Pela análise das taxas de positividade obtidas por técnicas diagnósticas, podemos observar que o aumento de número de lâminas de Kato-Katz ou uso de técnicas mais sensíveis aumentou consideravelmente (aproximadamente duas vezes) o número de indivíduos positivos para *S. mansoni*.

Tabela 18. Taxas de positividade obtidas pelas diferentes técnicas diagnósticas

Técnicas		Kato-Katz (2 lâminas)						p McNemar
		Positivo		Negativo		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	
Gradiente Salínico	Positivo	23	15,5	20	13,5	43	29,0	p < 0,05
	Negativo	0	0	105	70,9	105	70,9	
	TOTAL	23	15,5	125	84,5	148	100	
PCR-ELISA	Positivo	21	14,2	16	10,8	37	25,0	p < 0,05
	Negativo	2	1,3	109	73,7	111	75,0	
	TOTAL	23	15,5	125	84,5	148	100	
qPCR	Positivo	22	14,9	23	15,5	45	30,4	p < 0,05
	Negativo	1	0,6	102	68,9	103	69,6	
	TOTAL	23	15,5	125	84,5	148	100	
		Kato-Katz (24 lâminas)						
		Positivo		Negativo		TOTAL		p valor McNemar
		n	%	n	%	n	%	
Gradiente Salínico	Positivo	28	18,9	15	10,1	43	29,0	p < 0,05
	Negativo	3	2,0	102	68,9	105	70,9	
	TOTAL	31	20,9	117	79,0	148	100	
PCR-ELISA	Positivo	28	18,9	9	6,1	37	25,0	0,148
	Negativo	3	2,0	108	72,9	111	75,0	
	TOTAL	31	20,9	117	79,0	148	100	
qPCR	Positivo	30	20,3	15	10,1	45	30,4	P < 0,05
	Negativo	1	0,6	102	68,9	103	69,6	
	TOTAL	31	20,9	117	79,0	148	100	

7.15 Resultados obtidos pelas diferentes técnicas diagnósticas aplicadas na população da localidade de Estreito de Miralta

7.15.1 Técnica de Kato-Katz

7.15.1.1 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* com uma e duas lâminas de Kato-Katz

A taxa de positividade obtida pela leitura de uma lâmina de Kato-Katz foi de 9,2% (13/142) e a obtida pela análise de duas lâminas foi de 10,5% (15/142) (Tabela 19).

Tabela 19. Taxa de positividade obtida pela leitura de uma e duas lâminas da técnica de Kato-Katz, utilizando uma única amostra de fezes, na localidade Estreito de Miralta

Resultado	KK 1L1A		KK 2L1A	
	N	%	N	%
Negativo	129	90,8	127	89,5
Positivo	13	9,2	15	10,5
Total	142	100	142	100

7.15.1.2 Avaliação da taxa de positividade para infecção por *S. mansoni* obtida pela análise de 24 lâminas de Kato-Katz

A taxa de positividade obtida pela análise de 24 lâminas pela técnica de Kato-Katz foi de 19,7%, ou seja, foram detectados 28 participantes positivos para *S. mansoni* dentre os 142 indivíduos avaliados.

Tabela 20. Taxa de positividade obtida pela análise de 24 lâminas de Kato-Katz

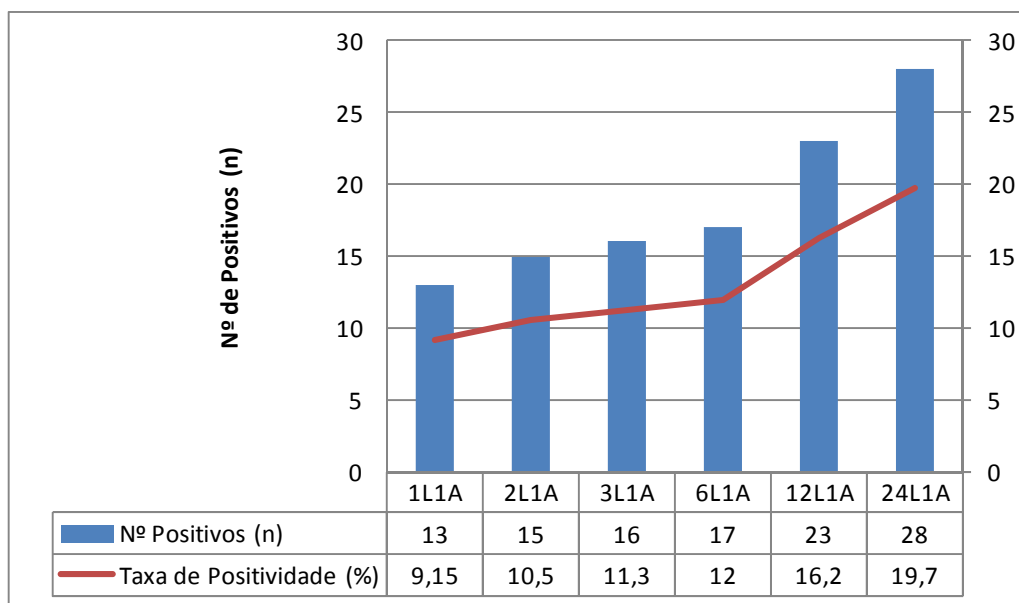
Resultado	KK 24L1A	
	N	%
Negativo	114	80,3
Positivo	28	19,7
Total	142	100

7.15.2 Efeito do aumento do número de lâminas de uma única amostra na taxa de positividade da técnica de Kato-Katz na detecção da infecção por *S. mansoni* na população da localidade de Estreito de Miralta

Os resultados obtidos pela técnica de Kato-Katz em uma lâmina, em duas lâminas, em três lâminas, em seis lâminas, em 12 lâminas e em 24 lâminas da mesma amostra foram avaliados. O efeito do aumento do número de lâminas é observado pelo aumento da taxa de positividade a cada lâmina adicional analisada.

Em uma lâmina de Kato-Katz, 13 (9,15%) indivíduos foram positivos, 15 (10,5%) em duas, 16 (11,3%) em três, 17 (12,0%) em seis, 23 (16,2%) em 12 lâminas e 28 (19,7%) em 24 lâminas (Gráfico 6).

Gráfico 6. Taxa de positividade acumulada decorrente do aumento do número de lâminas examinadas pela técnica de Kato-Katz em uma única amostra, na localidade de Estreito de Miralta, Montes Claros, Minas Gerais



7.16 Técnica do Gradiente Salínico

A taxa de positividade obtida pela técnica do Gradiente Salínico, pela análise dos sedimentos de duas porções de 500 mg de fezes, num total de 1000 mg, foi 18,3%, ou seja, foram detectados 26 participantes positivos para *S. mansoni* dentre os 142 indivíduos avaliados.

7.17 Prevalência da esquistossomose na localidade Estreito de Miralta

De acordo com os resultados obtidos pelas duas técnicas parasitológicas, pelo exame de 24 lâminas pela técnica de Kato-Katz e de 1000 mg pela técnica de Gradiente Salínico, foi detectada uma prevalência de 24,6%, sendo 35 positivos dos 142 participantes.

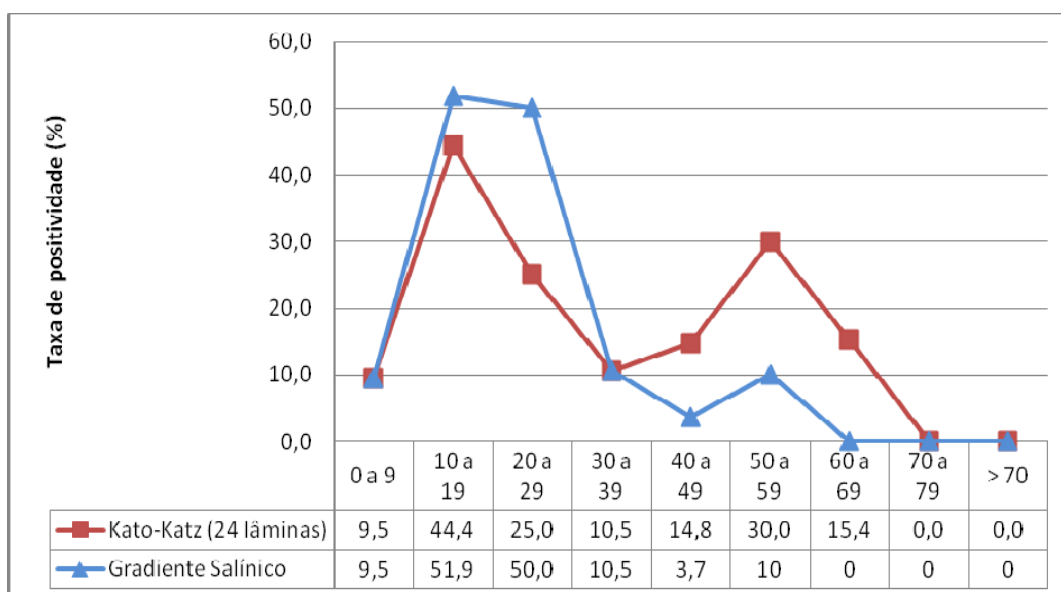
7.18 Positividade por faixa etária, gênero e localidade

7.18.1 Distribuição entre faixa etária e taxa de positividade para a esquistossomose entre os participantes da localidade Estreito de Miralta

O gráfico abaixo ilustra a positividade da esquistossomose na localidade Estreito de Miralta (MG), determinada pelos resultados obtidos pelo exame de 24 lâminas de Kato-Katz e pela técnica Gradiente Salínico, estratificada por oito faixas etárias.

Na distribuição da esquistossomose por faixa etária observa-se a maior taxa de positividade pela técnica de Gradiente Salínico entre adolescentes de 10-19 anos, seguida por adultos jovens (20-29 anos). Esta tendência também é acompanhada pelos valores de positividade obtidos pela técnica de Kato-Katz, porém observa-se um pico na faixa etária de 50 a 59 anos, com maior taxa de positividade pela técnica de KK.

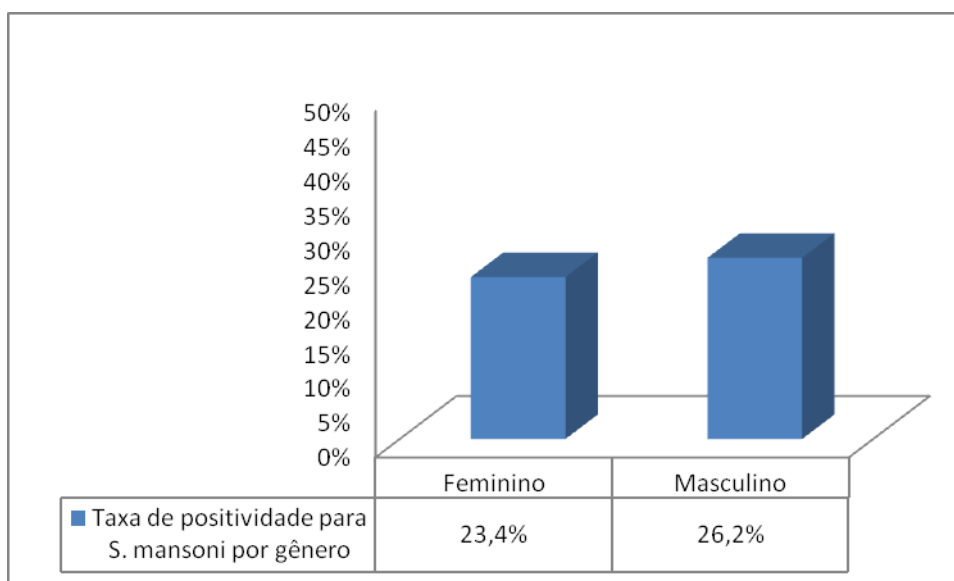
Gráfico 7. Comparação da proporção de indivíduos positivos pela técnica de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico em relação à faixa etária, na localidade Estreito de Miralta



7.18.2 Distribuição entre gênero dos participantes e taxa de positividade para a esquistossomose na localidade Estreito de Miralta

A população de estudo na localidade Estreito de Miralta era constituída por 142 participantes, 77 do gênero feminino e 65 do gênero masculino. Em relação à prevalência da esquistossomose, 35 participantes foram positivos para *S. mansoni*, sendo 23,4% do gênero feminino e 26,2% do gênero masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa da positividade entre os gêneros ($p= 0,702$).

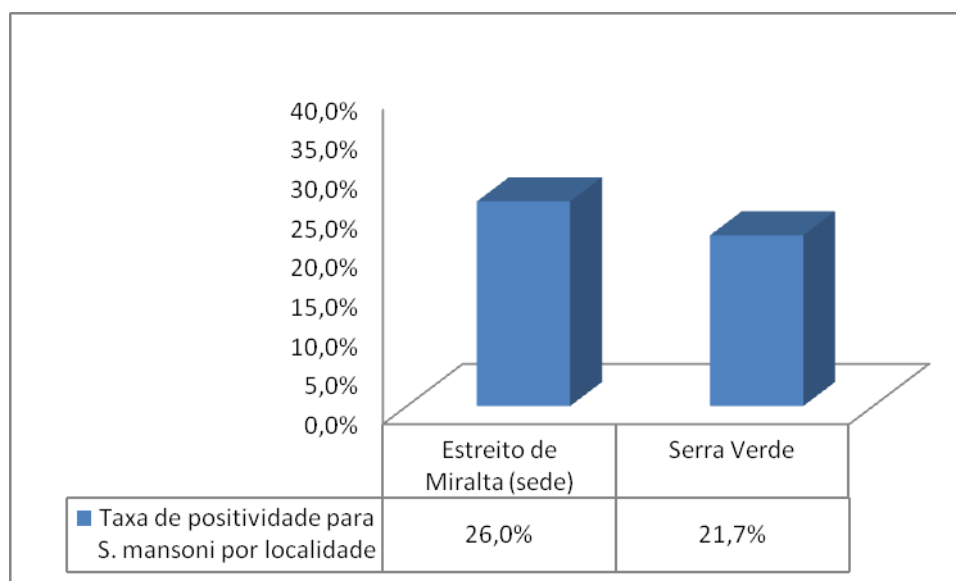
Gráfico 8. Taxa de positividade para a esquistossomose por gênero na localidade Estreito de Miralta, Montes Claros, Minas Gerais



7.18.3 Distribuição entre localidade e a taxa de positividade para a esquistossomose mansoni na localidade Estreito de Miralta

A localidade de Estreito de Miralta apresentou uma taxa de positividade de 26,0% (25/96) e a localidade de Serra Verde 21,7% (10/46). Não houve diferença estatisticamente significativa de positividade entre as localidades ($p= 0,577$) (Gráfico 9).

Gráfico 9. Taxa de positividade para esquistossomose em Estreito de Miralta (sede) e na localidade Serra Verde (adjacente)



7.18.4 Prevalência de helmintos e protozoários intestinais, detectados pelas técnicas parasitológicas, na população da localidade Estreito de Miralta

Na localidade Estreito de Miralta, em relação aos demais helmintos, as duas técnicas parasitológicas em combinação detectaram 26 positivos. A técnica de Kato-Katz detectou 14 (9,8%) positivos para ancilostomídeos, oito (5,6%) positivos para *Enterobius vermicularis*, um positivo para *Ascaris lumbricoides* e três positivos para *Hymenolepis nana*. Dos participantes infectados com *S. mansoni*, cinco apresentaram co-infecção com ancilostomídeos e dois com *E. vermicularis*.

Pela técnica do Gradiente Salínico, dentre os 142 participantes, 14 foram positivos para ancilostomídeos, sete para *Enterobius vermicularis*, um para *Ascaris lumbricoides* e dois para *Hymenolepis nana*. (Tabela 33, Apêndice B, item 10.2).

7.19 Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico

7.19.1 Comparação entre as técnicas de Kato-Katz (2 lâminas) e Gradiente Salínico

Os resultados da técnica do Gradiente Salínico foram comparados com os resultados obtidos pela leitura de duas lâminas de Kato-Katz. A técnica do GS detectou 26 (18,3%) participantes positivos para *S. mansoni* e o exame de duas lâminas de Kato-Katz revelaram 15 (10,5%) participantes positivos. Estas proporções apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). (Tabela 21). A co-positividade da técnica do Gradiente Salínico em

relação a duas lâminas de Kato-Katz foi de 93,3% (IC 95%: 70,2-98,8) e a co-negatividade 90,5% (IC 95%: 84,2- 94,5).

Tabela 21. Comparação entre os resultados apresentados pelas técnicas do Gradiente Salínico e Kato-Katz (2 lâminas), aplicadas para o diagnóstico da esquistossomose mansoni na população da localidade de Estreito de Miralta

		Kato-Katz (2 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
Gradiente	Positivo	14	12	26
Salínico	Negativo	1	115	116
Total		15	127	142

7.19.2 Comparação entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico

A comparação dos resultados apresentados pelas técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico, realizadas com 1000 mg de material fecal da mesma amostra, revelou taxas de positividade de 18,3% e 19,7%, respectivamente. Estas proporções não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,802$). As duas técnicas em combinação identificaram 35 positivos (24,6% de taxa de positividade) (Tabela 22). A co-positividade da técnica do Gradiente Salínico foi de 67,8% (IC 95%: 49,3 – 82,0) e a co-negatividade de 93,8% (IC 95%: 87,8 – 96,9).

Tabela 22. Comparação dos resultados apresentados pelas técnicas de Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico, aplicadas na população da localidade de Estreito de Miralta

		Kato-Katz (24 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
Gradiente	Positivo	19	7	26
Salínico	Negativo	9	107	116
Total		28	114	142

7.20 Diagnóstico Molecular – Ensaio de qPCR

O ensaio de qPCR, realizado com o DNA extraído de 1000 mg de fezes, detectou 26 (18,3%) amostras positivas para *S. mansoni* dentre os 142 participantes avaliados.

7.20.1 Avaliação comparativa entre os resultados obtidos pelas técnicas de Kato-Katz e qPCR utilizando a mesma amostra de fezes, na localidade Estreito de Miralta

Na comparação dos resultados do ensaio de qPCR com os resultados obtidos pela leitura de 2 lâminas de Kato-Katz, observa-se que 14 participantes com amostras positivas pela qPCR, não foram detectados pela técnica de KK. O exame de duas lâminas revelaram três positivos não detectados pela qPCR. As taxas de positividade obtidas pelas técnicas, 10,5% para KK (2 lâminas) e 18,3% para qPCR, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 23). A co-positividade do ensaio de qPCR em relação à duas lâminas de Kato-Katz foi de 80,0% (IC 95%: 54,8 – 92,9) e a co-negatividade de 88,9% (IC 95%: 82,3 - 93,3).

Tabela 23. Comparação entre as técnicas Kato-Katz (2 lâminas) e qPCR (1000 mg) aplicadas em amostras da população da localidade de Estreito de Miralta

		Kato-Katz (2 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	12	14	26
	Negativo	3	113	116
Total		15	127	142

7.20.2 Avaliação comparativa entre as técnicas de Kato-Katz e qPCR em relação à mesma quantidade de fezes examinada na localidade Estreito de Miralta

Os resultados do ensaio de qPCR (1000 mg) foram comparados com aqueles obtidos pela análise de 24 lâminas (1000 mg) de Kato-Katz. O qPCR detectou 26 indivíduos positivos para *S. mansoni*, 18,3% de taxa de positividade, enquanto a técnica de Kato-Katz (24 lâminas) detectou 28 positivos, apresentando uma taxa de positividade de 19,7%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estas proporções ($p = 0,813$) (Tabela 24). A co-positividade do ensaio de qPCR em relação a 24 lâminas de Kato-Katz foi de 64,3% (IC 95%: 45,8 – 79,3) e a co-negatividade de 92,9% (IC 95%: 86,7 – 96,4).

Tabela 24. Comparação entre o ensaio de qPCR e a técnica de Kato-Katz (24 lâminas)

		Kato-Katz (24 lâminas)		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	18	8	26
	Negativo	10	106	116
Total		28	114	142

7.20.3 Avaliação comparativa entre as técnicas Gradiente Salínico e qPCR em relação à mesma amostra de fezes examinada na localidade Estreito de Miralta

Os resultados do ensaio de qPCR foram comparados com os obtidos pela técnica do Gradiente Salínico, utilizando a mesma quantidade de amostra fecal (1000 mg). A qPCR foi concordante em 18 amostras positivas pelo GS, embora oito amostras positivas pelo GS não terem sido detectadas pela qPCR. A taxa de positividade do ensaio de qPCR foi de 18,3% (26/142), a mesma obtida pela técnica do Gradiente Salínico ($p = 1$). A co-positividade do ensaio de qPCR em relação à técnica do GS foi de 69,2% e a co-negatividade de 93,1%.

Tabela 25. Comparação entre o ensaio de qPCR e a técnica do Gradiente Salínico

		Gradiente Salínico		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	18	8	26
	Negativo	8	108	116
	Total	26	116	142

7.20.4 Avaliação comparativa entre os resultados do ensaio de qPCR (1000 mg) e o Teste Referência

Os resultados do ensaio molecular qPCR foram comparados com os obtidos pelo Teste Referência. Foram detectados 26 positivos para *S. mansoni* pelo qPCR, destes, seis indivíduos não foram detectados pelo Teste Referência, e 15 casos não foram detectados pelo qPCR (Tabela 26).

Tabela 26. Comparação entre o ensaio de qPCR e o Teste Referência [Kato-Katz (24 lâminas) + Gradiente Salínico (1000 mg)]

		Teste Referência		Total
		Kato-Katz (24 lâminas) e Gradiente Salínico (1000 mg)		
		Positivo	Negativo	
qPCR (1000 mg)	Positivo	20	6	26
	Negativo	15	101	116
	Total	35	107	142

A sensibilidade do ensaio de qPCR em relação ao Teste Referência foi de 57,1% apresentando uma especificidade de 94,4%, valor preditivo positivo de 76,9% e um valor preditivo negativo de 87,0% e uma acurácia diagnóstica de 85,2% (Tabela 27).

Tabela 27. Parâmetros avaliados para a técnica de qPCR (1000 mg) em relação ao Teste Referência

Parâmetro	Taxa	IC 95%
Sensibilidade	57,1%	40,8 - 72,0
Especificidade	94,4%	88,3 - 97,4
Valor Preditivo Positivo	76,9%	57,9 - 88,9
Valor Preditivo Negativo	87,0%	79,7 - 92,0
Acurácia	85,2%	78,4 - 90,1
Kappa	0,564	0.402 - 0.725

7.21 Concordância dos resultados apresentados pelos métodos diagnósticos parasitológico e molecular na localidade Estreito de Miralta

Duas lâminas de Kato-Katz apresentaram uma concordância *substancial* com GS e *moderada* com qPCR ($\kappa = 0,633$ e $0,521$). A técnica de Kato-Katz (24 lâminas) apresentou uma concordância *substancial* em relação ao GS ($\kappa = 0,634$), e *moderada* em relação à qPCR ($\kappa = 0,588$). A técnica do Gradiente Salínico apresentou uma concordância *substancial* em relação ao ensaio de qPCR ($\kappa = 0,623$) (Tabela 28).

Tabela 28. Concordância dos resultados apresentados pelos métodos de diagnóstico parasitológico e molecular aplicados na população da localidade de Estreito de Miralta

Concordância / Índice kappa		
	Gradiente Salínico	qPCR
Kato-Katz (2 lâminas)	Substancial / 0,633	Moderada / 0,521
Kato-Katz (24 lâminas)	Substancial / 0,634	Moderada / 0,588
qPCR (1000 mg)	Substancial / 0,623	--

7.22 Síntese dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas na localidade de Estreito de Miralta

Pela análise das taxas de positividade obtidas por técnicas diagnósticas, podemos observar que o aumento de número de lâminas de Kato-Katz ou a combinação de técnicas aumentou consideravelmente o número de indivíduos positivos para *S. mansoni* (Tabela 29).

Tabela 29. Taxas de positividade obtidas pelas diferentes técnicas diagnósticas

		Kato-Katz (2 lâminas)						p McNemar
		Positivo		Negativo		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	
Gradiente Salínico	Positivo	14	9,8	12	8,5	26	18,3	p < 0,05
	Negativo	1	0,7	115	81	116	81,7	
	TOTAL	15	10,5	127	89,5	142	100	
		n	%	n	%	n	%	
qPCR	Positivo	12	8,5	14	9,8	26	18,3	p < 0,05
	Negativo	3	2,1	113	79,6	116	81,7	
	TOTAL	15	10,5	127	89,5	142	100	

		Kato-Katz (24 lâminas)						p McNemar
		Positivo		Negativo		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	
Gradiente Salínico	Positivo	19	13,3	7	5,0	26	18,3	0,802
	Negativo	9	6,4	107	75,3	116	81,7	
	TOTAL	28	19,7	114	80,3	142	100	
		n	%	n	%	n	%	
qPCR	Positivo	18	12,7	8	5,6	26	18,3	0,813
	Negativo	10	7,0	106	74,7	116	81,7	
	TOTAL	28	19,7	114	80,3	142	100	

7.23 Intensidade de Infecção

Na localidade Estreito de Miralta, todos participantes positivos para *S. mansoni* apresentavam carga parasitária baixa (< 100 opg), independente da técnica diagnóstica utilizada. A carga parasitária populacional obtida pela média geométrica do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes pela técnica de Kato-Katz foi 6,2 opg e a mediana 6 opg. Pela técnica do Gradiente Salínico a média geométrica foi 4,6 opg e a mediana 4,5 opg.

7.24 Tratamento e avaliação clínica dos participantes positivos para esquistossomose mansoni nas duas localidades estudadas

Na ocasião do tratamento dos participantes positivos para *S. mansoni* e demais helmintos, foi aplicada uma ficha clínica e epidemiológica (Anexo 11.4), na qual foram levantadas questões relativas aos sinais e sintomas que o paciente apresentara nos últimos 30 dias, bem como antecedentes pessoais e cada participante foi submetido ao exame clínico.

Na localidade de Tabuas, dos 46 participantes positivos para *S. mansoni* pela combinação das duas técnicas parasitológicas (Kato-Katz – 24 lâminas e Gradiente Salínico), 37 participaram da avaliação clínica (22 do sexo feminino / 15 do sexo masculino) (Tabela 34, Apêndice 10.3).

Na localidade de Estreito de Miralta, dos 35 participantes positivos para *S. mansoni* pela combinação das duas técnicas parasitológicas (Kato-Katz – 24 lâminas e Gradiente Salínico), 31 participaram da avaliação clínica (14 do sexo feminino / 17 do sexo masculino) (Tabela 35, Apêndice 10.4).

7.25 Controle de cura dos indivíduos infectados e tratados na localidade Tabuas

Na etapa de acompanhamento 30 dias após o tratamento, dentre os 46 participantes positivos para *S. mansoni* que foram tratados com praziquantel, 39 participaram da avaliação de cura. Tanto pela técnica de Kato-Katz quanto pelas técnicas do Gradiente Salínico e qPCR não foi detectado nenhum participante positivo para *S. mansoni*. Pela técnica de PCR-ELISA foram detectados quatro positivos para *S. mansoni*.

Dentre os participantes positivos para *S. mansoni* tratados com praziquantel, 36 participaram da avaliação de cura 90 dias após o tratamento. Entre estes foram detectados três participantes positivos para *S. mansoni*, sendo um detectado por ambas as técnicas e os outros dois identificados isoladamente por cada técnica parasitológica. Pela técnica de PCR-ELISA foram detectados quatro participantes positivos para *S. mansoni* e pelo ensaio de qPCR foram detectados seis positivos para *S. mansoni*.

Na etapa de acompanhamento 180 dias após o tratamento, 37 indivíduos participaram da avaliação de cura. Entre estes, oito foram positivos para *S. mansoni* por ambas as técnicas parasitológicas. Pela técnica de PCR-ELISA foram detectados 12 indivíduos positivos para *S. mansoni* e pelo ensaio de qPCR foram detectados 14 positivos para *S. mansoni*.

Tabela 30 Monitoramento de cura 30, 90 e 180 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato-Katz, Gradiente Salínico, PCR-ELISA e qPCR.

Monitoramento de Cura			
Técnicas	30 dias	90 dias	180 dias
Kato-Katz	100%	94,4%	78,4%
	(39/39)	(34/36)	(29/37)
Gradiente Salínico	100%	94,4%	78,4%
	(39/39)	(34/36)	(29/37)
PCR-ELISA	89,7%	88,8%	67,5%
	(35/39)	(32/36)	(25/37)
qPCR	100%	83,3%	62,1%
	(39/39)	(30/36)	(23/37)

7.26 Controle de cura dos indivíduos infectados e tratados na localidade Estreito de Miralta

Na avaliação de cura 30 dias após o tratamento, dentre os 35 participantes positivos para *S. mansoni*, 30 forneceram novas amostras de fezes para uma segunda avaliação. Tanto pela técnica de Kato-Katz quanto pela técnica do Gradiente Salínico e pela qPCR foram detectados dois participantes positivos para *S. mansoni*.

Na avaliação de cura 90 dias após o tratamento, dentre os 35 participantes positivos para *S. mansoni* que foram tratados com praziquantel, 33 coletaram fezes para uma segunda avaliação parasitológica. Pelas técnicas de Kato-Katz e de Gradiente Salínico foi detectado um participante positivo para *S. mansoni* por cada técnica. Pelo ensaio de qPCR foram detectados estes 02 participantes.

Na avaliação de cura 180 dias após o tratamento, dentre os 35 participantes positivos no exame inicial, 29 forneceram novas amostras de fezes para uma segunda avaliação parasitológica. Pela técnica de Kato-Katz e pelo ensaio de qPCR foi detectado um participante positivo para *S. mansoni*. Pela técnica do Gradiente Salínico não foi detectado nenhum participante positivo para *S. mansoni*.

Tabela 31 Monitoramento de cura 30, 90 e 180 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato-Katz, Gradiente Salínico e qPCR.

Monitoramento de Cura			
Técnicas	30 dias	90 dias	180 dias
Kato-Katz	93,3% (28/30)	96,9% (32/33)	96,5% (28/29)
Gradiente Salínico	93,3% (28/30)	96,9% (32/33)	100% (29/29)
qPCR	93,3% (28/30)	93,9% (31/33)	96,5% (28/29)

8 DISCUSSÃO

As técnicas parasitológicas permanecem como a principal forma de diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas endêmicas. Estas são amplamente utilizadas para o diagnóstico dessa doença, seja pelo fato de fornecerem diagnóstico de certeza, seja pela eficácia e pelo custo-benefício. Entretanto, uma significativa redução da sensibilidade é observada em áreas de baixa endemicidade, fato este que compromete a estimativa da prevalência real da doença (Enk et al. 2008; Siqueira et al. 2011). Apesar da utilização restrita de métodos de imunodiagnóstico e moleculares, melhorias e avanços recentes têm sido alcançados.

O principal fator nesta nova era de diagnóstico da esquistossomose é a revisão do conceito de “Padrão-Ouro” (Cavalcanti et al. 2013). Para avaliar um novo teste precisamos de um Padrão-Ouro que é a designação de um método altamente sensível e específico, utilizado em estudo comparativo com o novo teste. Um método padrão é aquele reconhecido nacionalmente e internacionalmente como melhor, ou na sua ausência o melhor método disponível, preferencialmente validado por publicações em revistas científicas de elevado conceito (OIE, 2010). Após o ensaio das amostras, utilizando o teste em estudo simultaneamente com o método referência, o desempenho diagnóstico é avaliado. A técnica de Kato-Katz (KK) é mundialmente utilizada pelo seu baixo custo e por sua praticidade em situações de infraestrutura laboratorial precária e também por permitir uma quantificação da intensidade de infecção. Entretanto, essa técnica quando realizada com reduzido número de lâminas (uma ou duas) apresenta sensibilidade diminuída, quando aplicada em indivíduos apresentando carga parasitária baixa, o que é comumente encontrado entre a maioria dos residentes de áreas de baixa prevalência (Rabello 1997). Assim, esta técnica que antes era considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da esquistossomose, na atual situação epidemiológica do país, fica discutível seu uso para esse propósito.

No Brasil, a implementação de medidas de controle, tais como, a quimioterapia específica e saneamento básico, promoveram uma redução da transmissão e da morbidade da esquistossomose mansoni em áreas endêmicas. Apesar das melhorias no diagnóstico parasitológico, ainda pode haver falhas na detecção de todos os indivíduos infectados por *S. mansoni*, especialmente em áreas de baixa endemicidade, onde a maioria dos indivíduos apresenta carga parasitária baixa (menor que 100 opg) e geralmente são assintomáticos ou oligosintomáticos (Katz et al. 1986). Assim, a aplicação do exame parasitológico no diagnóstico de indivíduos apresentando baixa carga parasitária, no monitoramento de cura após intervenção terapêutica e seu uso no monitoramento da diminuição da transmissão ou

mesmo da eliminação da doença é limitado. Monitoramentos e avaliações subsequentes necessitam de métodos de detecção mais sensíveis a fim de se reavaliar possíveis re-infecções (Berhe et al. 2004). Embora os exames parasitológicos tradicionais empregados, apresentem vantagens tais como elevada especificidade, forneçam uma medida quantitativa da infecção, e no caso da técnica de Kato-Katz, ter habilidade para concomitantemente diagnosticar *S. mansoni* e geohelminthos (Bergquist et al. 2009; Utzinger et al. 2011), eles são pouco sensíveis em situações de intensidade de infecção baixa, e laboriosos por necessitar de leitura microscópica.

Neste estudo, avaliou-se o desempenho diagnóstico das técnicas de Kato-Katz (KK), Gradiente Salínico (GS), e os ensaios moleculares PCR-ELISA e qPCR, para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni em indivíduos residentes em áreas de baixa transmissão. Áreas de baixa transmissão são definidas como áreas onde há a distribuição focal de caramujos do gênero *Biomphalaria* susceptíveis e a prevalência de 25% ou menos da esquistossomose mansoni na população examinada, com a predominância de baixa intensidade de infecção (75%) e baixa morbidade, sendo a maioria dos indivíduos assintomáticos (Alarcón de Noya et al. 2006).

Na localidade Tabuas, amostras de fezes de 148 indivíduos foram examinadas pelas quatro técnicas e os resultados foram analisados e comparados. Quando foram combinados os resultados obtidos pelo KK com os do GS, a positividade foi de 31,0% (46/148). O ensaio de PCR-ELISA apresentou taxa de positividade de 25,0% (37/148) e o ensaio de qPCR 30,4% (45/148). Na localidade Estreito de Miralta, foi detectada uma prevalência de 24,6%, sendo 35 positivos dos 142 participantes. As técnicas parasitológicas do Gradiente Salínico e de Kato-Katz (24 lâminas) revelaram taxas de positividade de 18,3% (26/142) e 19,7% (28/142), respectivamente. O ensaio de qPCR detectou 26 (18,3%) participantes positivos.

Fato observado nestas duas localidades foi o efeito do aumento do número de lâminas de Kato-Katz na taxa de positividade para infecção por *S. mansoni*. Este fato pode ser demonstrado pelo aumento nas taxas de positividade de 12,1% (18/148), 15,5% (23/148), e 20,9% (31/148) quando foram considerados os resultados obtidos na leitura de uma, duas e 24 lâminas, respectivamente. Este comportamento foi observado por outros autores (Rabello 1997; Enk et al. 2008; Siqueira et al. 2011), a medida que se aumenta o número de lâminas examinadas, aumenta-se a taxa de positividade desta técnica. Porém é relevante salientar que na localidade de Tabuas, uma área em que os indivíduos infectados apresentavam baixa a moderada carga parasitária, em uma mesma amostra atinge-se um platô, onde a partir de um determinado número de lâminas, não se observa um aumento da taxa de positividade. Nesta área foi possível demonstrar que a taxa de positividade manteve-se inalterada a partir da

análise de seis lâminas de Kato-Katz da mesma amostra. O mesmo não ocorreu na localidade Estreito de Miralta, a carga parasitária muito baixa influenciou neste parâmetro, o aumento do número lâminas aumenta a taxa de positividade. Este resultado nos permite inferir que para a tomada de decisão diagnóstica, precisamos levar em consideração as peculiaridades de cada área e das características intrínsecas da população.

A concordância observada quando os resultados das técnicas Kato-Katz, Gradiente Salínico, PCR-ELISA e qPCR utilizando a mesma quantidade de material fecal (1000mg), foram correlacionados na localidade Tabuas foi substancial. Já na localidade de Estreito de Miralta, a concordância entre as técnicas de Kato-Katz e qPCR foi moderada. Nesta mesma localidade, a técnica do Gradiente Salínico e o ensaio de qPCR apresentaram concordância substancial. Estes dados demonstram a influência da carga parasitária individual no desempenho das técnicas diagnósticas utilizadas.

Os resultados deste estudo mostram claramente uma significativa subestimativa da taxa de positividade para esquistossomose mansoni obtida com uma ou duas lâminas de Kato-Katz e confirma dados publicados por outros autores. Estudo realizado por Enk et al. (2008), demonstrou que a prevalência de 13,8% obtida com uma lâmina de Kato-Katz de uma única amostra de fezes, aumenta para 27,2%, com 10 lâminas em três amostras, e chega a 35,4%, pela combinação de exames denominada “Padrão Ouro”, na localidade de Chonim de Cima, Governador Valadares, Minas Gerais. Em outro estudo realizado por nosso grupo, verificou-se que a prevalência obtida pela análise de uma única lâmina pela técnica de Kato-Katz com a combinação dos resultados obtidos pela análise de 18 lâminas de quatro amostras examinadas pela mesma técnica e de três amostras de 500 mg examinadas pela técnica de TF-Test, observou-se um aumento da prevalência de 8,0% para 35,8%, ou seja, um aumento de 4,5 vezes (Siqueira et al. 2011), na localidade de Pedra Preta, Montes Claros, Minas Gerais.

A taxa de positividade da esquistossomose na localidade Tabuas obtida com uma lâmina de Kato-Katz foi de 12,1% e a obtida pela combinação dos exames parasitológicos (Kato-Katz - 24 lâminas e Gradiente Salínico - 1000 mg) foi de 31,0%, ou seja, seria necessária uma correção de 2,5 vezes para se estimar a prevalência real na área estudada. Em Estreito de Miralta, este mesmo fato foi observado. A taxa de positividade obtida pela análise de uma lâmina de Kato-Katz foi 9,2% e esta taxa aumentou para 24,6%, com a combinação dos resultados das duas técnicas parasitológicas (KK- 24 lâminas e GS- 1000 mg), um aumento de 2,5 vezes. Este fato pode explicar o motivo pelo qual as estratégias de controle em áreas com prevalência inferior a 15% são menos eficazes. A maioria das estratégias de controle baseia-se no exame de uma ou duas lâminas de KK de uma única amostra de fezes para identificar e tratar os indivíduos infectados, o que significa que apenas um em cada três

indivíduos positivos são tratados. Assim, cerca de 70% da população infectada continua a eliminar ovos de *S. mansoni*, contribuindo para a manutenção da transmissão da doença na área, além de estarem sujeitas ao risco de desenvolver formas ectópicas da doença, especialmente a mielorradiculopatia esquistossomótica, bem como outras complicações associadas à morbidade da doença, que podem ocorrer mesmo entre pacientes apresentando baixas cargas parasitárias (Gryssels et al. 2006; Lambertucci et al. 2007). Esta evidência enfatiza a urgente necessidade de um método diagnóstico mais sensível para vigilância desde casos individuais a inquéritos populacionais em áreas de baixa transmissão (Enk et al. 2012).

Apesar da técnica de PCR ser amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças humanas, sua aplicação para doenças negligenciadas, especialmente para a esquistossomose, somente recentemente tem sido explorada. Pontes et al. (2002) relatou pela primeira vez o uso da PCR para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em amostras fecais. Altas taxas de sensibilidade e especificidade desta técnica foram obtidas por alguns autores (Pontes et al. 2003; Allam et al. 2009; Gomes et al. 2010) quando comparada ao exame parasitológico de rotina, a técnica de Kato-Katz. Neste estudo, os ensaios de PCR (PCR-ELISA e qPCR) foram avaliados e os resultados encontrados foram animadores. Apesar do custo relativamente alto que as técnicas apresentam, estas se mostraram ferramentas valiosas para o diagnóstico da esquistossomose, podendo ser aplicadas na comparação e validação de métodos diagnósticos e sendo muito útil na confirmação de casos suspeitos que não foram detectados pelos métodos parasitológicos convencionais. Ressalta-se ainda a grande importância destas técnicas para a avaliação de cura após o tratamento quimioterápico. Quando se trata da escolha de medidas de intervenção, o alto custo da PCR por si é usado frequentemente como um argumento para não introduzi-la. Entretanto, o custo-efetividade é o melhor argumento para esta tomada de decisão em situações especiais.

Na localidade Tabuas, a análise de resultados discordantes revelou 10 amostras que foram positivas pelos métodos parasitológicos e negativos para o PCR-ELISA (7 amostras positivas apenas pelo Gradiente Salínico e 3 positivas apenas pela técnica de Kato-Katz examinando-se 24 lâminas). Estes 10 pacientes apresentavam cargas parasitárias muito baixas (entre 2 e 27 opg). Várias razões podem contribuir para estes resultados negativos pelo PCR-ELISA, incluindo a possibilidade de ausência de ovos na amostra utilizada na reação, o que pode ser atribuído à variação na eliminação diária e distribuição de ovos nas fezes (Engels et al. 1996). Outras possíveis razões são a degradação do DNA e a presença de inibidores da PCR. Entretanto, nesse estudo, essas duas limitações podem ser descartadas já que estas amostras apresentavam resultados positivos para a amplificação do gene da beta-actina humano (controle interno da reação). A segunda razão pode ser explicada pelo aumento da

quantidade de material fecal (1000 mg) utilizado na extração do DNA, paradoxalmente o aumento na quantidade de fezes apesar de aumentar a sensibilidade da técnica, parece aumentar os inibidores da reação.

Em relação ao desempenho diagnóstico do ensaio de qPCR na localidade Tabuas, apenas um participante com ovos em suas fezes, diagnosticado pela técnica de Kato-Katz, não foi identificado pela qPCR, o que pode ser explicado pela ausência de ovos na amostra examinada. A qPCR detectou 15 indivíduos positivos não identificados pela técnica de Kato-Katz, examinando-se 24 lâminas. Considerando a técnica do Gradiente Salínico, oito participantes que foram positivos por esta técnica não foram identificados pela qPCR, isto pode ser devido ao fato destes pacientes apresentarem cargas parasitárias muito baixas (< 5 opg). Resultados similares foram apresentados por Rabello et al. (2002) e Pontes et al. (2003) utilizando a PCR convencional, onde a detecção dos produtos amplificados foram detectados por visualização em eletroforese em gel corado com nitrato de prata. Estes autores relataram que em 194 participantes estudados, 16 indivíduos com PCR positiva não apresentaram ovos nas fezes, enquanto dois participantes positivos pela técnica de Kato-Katz foram negativos na PCR. Pontes et al. (2003) explicam que os casos positivos não detectados pela PCR, podem ocorrer devido a vários fatores, dentre eles a inibição da amplificação por compostos fecais e/ou degradação do DNA durante o transporte do campo para o laboratório, ou ainda devido a ausência de ovos na amostra analisada.

Em estudo realizado por Gomes et al., 2010, o ensaio de PCR-ELISA aplicado em amostras de fezes de 206 participantes de área endêmica e comparado com os resultados obtidos pelo exame de 12 lâminas de Kato-Katz de uma única amostra, revelou uma sensibilidade de 97,4% e uma especificidade de 85,1%, ambas maiores do que as obtidas no presente estudo. Esta diferença pode ser justificada, como já descrito, por fatores inerentes aos procedimentos experimentais que geram falhas na detecção do DNA do parasito, sua degradação durante coleta da amostra biológica ou mesmo sua ausência na amostra analisada. Deve ser salientada ainda a necessidade de técnicos bem treinados aplicando rigorosamente as medidas de controle de qualidade em todas as etapas da reação, para também evitar resultados falso-negativos ou mesmo falso-positivos por contaminação. Quando se utiliza técnicas *in-house* (não-comerciais), os métodos moleculares podem apresentar perda de padronização (reprodutibilidade) e robustez. Estes critérios são requeridos para uma possível aplicação destes métodos em programas de controle, onde as decisões não podem ser baseadas em resultados investigacionais (Gomes et al. 2009).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os ensaios de PCR são alternativas viáveis para o diagnóstico das infecções por *S. mansoni*. O ensaio de qPCR, na

localidade Tabuas, se mostrou uma técnica extremamente sensível e específica quando comparada ao tradicional exame parasitológico de fezes, a técnica de Kato-Katz, realizada com 24 lâminas, e foi semelhante à técnica do GS. Embora na localidade de Estreito de Miralta os resultados não terem se reproduzido, atribuímos este fato às características peculiares da área e dos indivíduos infectados, do que propriamente ao desempenho das técnicas. Apesar da baixa carga parasitária apresentada pelos indivíduos infectados nesta localidade, o ensaio de qPCR apresentou uma taxa de positividade de 18,3%, aproximadamente duas vezes maior que a obtida pela técnica de Kato-Katz (2 lâminas). Este fato foi também observado por Espírito-Santo et al. (2014), onde a taxa de positividade obtida pelo ensaio de qPCR (9,6%) foi 6,8 vezes maior que aquela obtida pelos resultados em combinação das técnicas parasitológicas de Kato-Katz e de Sedimentação Espontânea (HPJ) (0,9%), examinando-se duas lâminas por cada técnica, em estudo realizado com 572 indivíduos.

Os ensaios de PCR foram realizados em laboratório de pesquisa, onde a infraestrutura não é a mesma encontrada nos laboratórios de rotina. Alguns requisitos são necessários para execução destes ensaios: 1) treinamento de pessoal; 2) espaço de trabalho apropriado com salas separadas para prevenir contaminação cruzada 3) manutenção de equipamentos; 4) controle de qualidade. Amostras fecais são conhecidas pela heterogeneidade e dificuldade para análise molecular. Neste estudo, foi utilizado o kit comercial QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit para extração de DNA nas fezes a fim de evitar interferências metodológicas no procedimento. Métodos físicos (separação de salas e materiais, uso de câmara de fluxo laminar com luz UV) foram aplicados durante o procedimento a fim de minimizar a chance de contaminação das amostras.

O ensaio de PCR-ELISA, usando um kit comercial (Plate PCR Detection Kit, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi empregado para o diagnóstico da esquistossomose mansoni na população de Pedra Preta (Anexo 11.1). Entretanto, a produção do kit foi descontinuada pelo fabricante, fato que gerou a necessidade do desenvolvimento do PCR-ELISA “*in-house*”, que foi empregado para diagnóstico da esquistossomose mansoni na população de Tabuas. A redução de custo do ensaio de PCR-ELISA “*in-house*” para o diagnóstico de *S. mansoni* em relação ao uso de kit de ELISA comercial representa mais uma vantagem no desenvolvimento do protótipo laboratorial, uma vez que o maior desafio para o uso dos testes moleculares em inquéritos epidemiológicos é o elevado custo das técnicas. As técnicas parasitológicas (Kato-Katz e Gradiente Salínico) ainda possuem as melhores condições de eficácia associadas ao custo, porém os ensaios moleculares (PCR-ELISA e qPCR) podem apresentar uma alternativa para ser usada juntamente com as técnicas

parasitológicas em áreas onde há baixa intensidade de infecção, no intuito de evitar o aumento do número de resultados falso negativos.

No monitoramento de cura na localidade Tabuas, 30, 90 e 180 dias após o tratamento, pelas técnicas de Kato-Katz e Gradiente Salínico, foi observado que houve uma redução dos indivíduos infectados. A taxa de cura para esquistossomose obtida pelas técnicas parasitológicas 30 dias após o tratamento foi de 100%. Noventa dias após o tratamento, três indivíduos foram positivos para *S. mansoni* pelo método parasitológico. Na última etapa de avaliação, 180 dias após o tratamento, dos 37 que tiveram suas amostras de fezes reexaminadas, oito indivíduos apresentaram ovos de *S. mansoni* nas fezes. A baixa taxa de cura observada a partir de seis meses após a administração do tratamento pode ser explicada por duas possíveis razões: 1^a) falha terapêutica (fêmeas sobreviventes cessaram temporariamente a ovoposição sobre efeito do medicamento e a retomaram posteriormente); 2^a) devido às reinfecções a que estão expostos os indivíduos residentes na área endêmica. Provavelmente aqueles indivíduos que foram positivos para *S. mansoni*, foram tratados e se reinfetaram voltando a excretar ovos nas etapas 90 ou 180 dias após tratamento.

A diferença entre as taxas de cura obtidas pelas técnicas moleculares e parasitológicas pode ser explicada por dois motivos. Primeiro, pelo fato do DNA de vermes mortos ou de ovos remanescentes nos tecidos permanecerem por um período de tempo mesmo após o tratamento. Segundo, isto pode ser devido à sensibilidade dos ensaios de PCR ser maior que as técnicas parasitológicas na detecção de baixas cargas parasitárias (Wichmann et al. 2013).

Os resultados de prevalência por gênero e localidade, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as proporções obtidas, este fato pode ser explicado pela homogeneidade da população em relação aos aspectos socioeconômicos e relativos às atividades de trabalho exercidas, bem como pelo comportamento semelhante de contato com águas contaminadas. Em relação à prevalência obtida por faixa etária, podemos observar que a curva de prevalência da esquistossomose segue um mesmo padrão e independe da técnica diagnóstica utilizada. As maiores taxas foram observadas entre adolescentes (10-19 anos), seguido por adultos jovens (20-29 anos), o que demonstra claramente a importância e contribuição destes grupos etários para a epidemiologia da doença.

Em relação à avaliação clínica, a maioria dos indivíduos infectados era assintomática. Embora sinais não específicos da infecção possam auxiliar no diagnóstico, a demonstração de ovos nas fezes permanece a principal forma de confirmação de casos. Considerando que o ser humano é o principal hospedeiro vertebrado para manutenção da transmissão no ambiente natural, com um diagnóstico mais preciso e tratamento de quase todos infectados, torna-se evidente a possibilidade de uma redução drástica da força de transmissão da doença ou ainda

sua completa interrupção. Avaliação de reinfecções, quatro anos após intervenção inicial, com metodologia semelhante, está sendo realizada na localidade de Pedra Preta, também no município de Montes Claros e os resultados apontam para a ausência de novos casos. Esta situação é peculiar, pois associada a esta prospecção profunda de casos, houve a estiagem da fonte de água natural onde ocorriam as infecções (Trabalho de Doutorado em andamento).

Apesar do trabalho relativo, devido ao exame de 24 lâminas de Kato-Katz e todo o sedimento de dois procedimentos pela técnica do Gradiente Salínico, associado à execução dos ensaios moleculares que exigem infraestrutura laboratorial mais sofisticada, uma única intervenção, usando uma única amostra de fezes por paciente, seria altamente compensador, do ponto de vista logístico e de retorno para a população infectada pelo tratamento imediato. Diferentemente da metodologia atual adotada pelo Programa de Controle da Esquistossomose (uma ou duas lâminas de Kato-Katz), que subestima a prevalência real em áreas endêmicas, detectando em algumas áreas somente 25% dos indivíduos realmente infectados (Siqueira et al., 2011), o que leva a vários ciclos de exames das populações e tratamentos consecutivos.

A qualidade dos dados gerados é diretamente dependente da avaliação adequada dos métodos diagnósticos e será de grande importância para as tomadas de decisões em saúde pública, especialmente nos programas de controle da doença. Dentre as limitações metodológicas deste estudo podemos citar o problema do padrão de referência, uma vez que a técnica antes considerada como padrão-ouro para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, apresenta sensibilidade limitada em situações de baixa carga parasitária. Outra limitação são as relações complexas apresentadas entre cada técnica diagnóstica isoladamente ou em combinação. O tamanho amostral no monitoramento de cura também é outro fator limitante, uma vez que é decorrente do número de indivíduos positivos detectados, e por ser um valor relativamente baixo não permite extrapolar os resultados obtidos como providos de validade externa. O guia de diretrizes STARD (STAndards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies) consiste de uma lista de 25 itens e tem como objetivo melhorar a acurácia e completude da comunicação de estudos diagnósticos, para permitir aos leitores aferir o potencial para viés de um estudo (validade interna) e avaliar sua generabilidade externa. Neste estudo, foi contemplada a maioria destes itens, como pode ser verificado no check-list do Anexo 11.3.

Com os resultados obtidos podemos fornecer subsídios para a tomada de decisão diagnóstica. Nossos dados sugerem que a escolha de um método para ser utilizado em estudos epidemiológicos dependerá do objetivo que se almeja alcançar. Para o controle da morbidade, a técnica de Kato-Katz seria suficiente, pois detectaria os casos com cargas parasitárias mais altas e, assim prontamente, os pacientes seriam tratados não permitindo que a doença

progredisse para quadros clínicos mais graves. Já para o controle da transmissão e para uma avaliação clínica mais precisa, abordagens com maior sensibilidade seriam mais indicadas, tais como as técnicas de Kato-Katz (com maior número de lâminas) e do Gradiente Salínico e os ensaios de PCR, especialmente este último para laboratórios de referência que possuem a infraestrutura necessária para a execução destes ensaios.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo podemos concluir que a limitação de sensibilidade dos métodos diagnósticos disponíveis é preocupante em áreas de baixa transmissão. Ao longo dos anos tem havido mudanças no perfil epidemiológico da esquistossomose em áreas submetidas a ações de controle, com conseqüente aumento do número de áreas de baixa transmissão e redução da carga parasitária dos indivíduos portadores da infecção por *S. mansoni*, o que demanda o emprego de métodos diagnósticos mais sensíveis na identificação dos casos.

Os resultados são relevantes particularmente para o aperfeiçoamento das medidas de controle da morbidade e de transmissão. O emprego de um método sensível é fundamental para que a infecção seja detectada e o paciente seja prontamente tratado, reduzindo assim a chance da doença evoluir para formas clínicas mais graves (hepatomegalia e esplenomegalia). Sob o ponto de vista do controle da transmissão, este estudo reforça a necessidade do desenvolvimento de abordagens diagnósticas novas com o objetivo de aumentar a probabilidade de detectar indivíduos com cargas parasitárias baixas, evitando que estes sejam os mantenedores do ciclo de transmissão da doença na área.

O modelo atual adotado pelo serviço de saúde pública não elimina a massa crítica de infectados que permite a manutenção da transmissão, necessitando assim de repetidas intervenções o que torna este modelo ineficiente, logisticamente complicado e oneroso para os cofres públicos.

10 CONCLUSÕES

1. A análise de duas lâminas pela técnica de Kato-Katz (procedimento de rotina dos programas de controle) subestimou a prevalência real da doença nas áreas estudadas;
2. O aumento no desempenho da técnica de Kato-Katz pelo acréscimo do número de lâminas analisadas é diretamente dependente da intensidade de infecção da população;
3. A técnica do Gradiente Salínico por apresentar bom desempenho e baixo custo pode ser indicada para aplicação em estudos epidemiológicos;
4. As técnicas de biologia molecular, especialmente o ensaio de qPCR, se mostraram alternativas viáveis, principalmente para o diagnóstico da doença em indivíduos com baixa carga parasitária. Embora ainda sejam de alto custo, poderiam ser utilizadas em laboratórios de referência que dispõem da infraestrutura necessária;
5. Os dados de monitoramento de cura reforçam que a eficiência do controle da esquistossomose depende não somente do diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados, mas também de ações conjuntas de controle.
6. Com base nos resultados de desempenho das técnicas diagnósticas avaliadas nas duas localidades de estudo foi possível a construção de árvores de decisão, conforme apresentado a seguir.

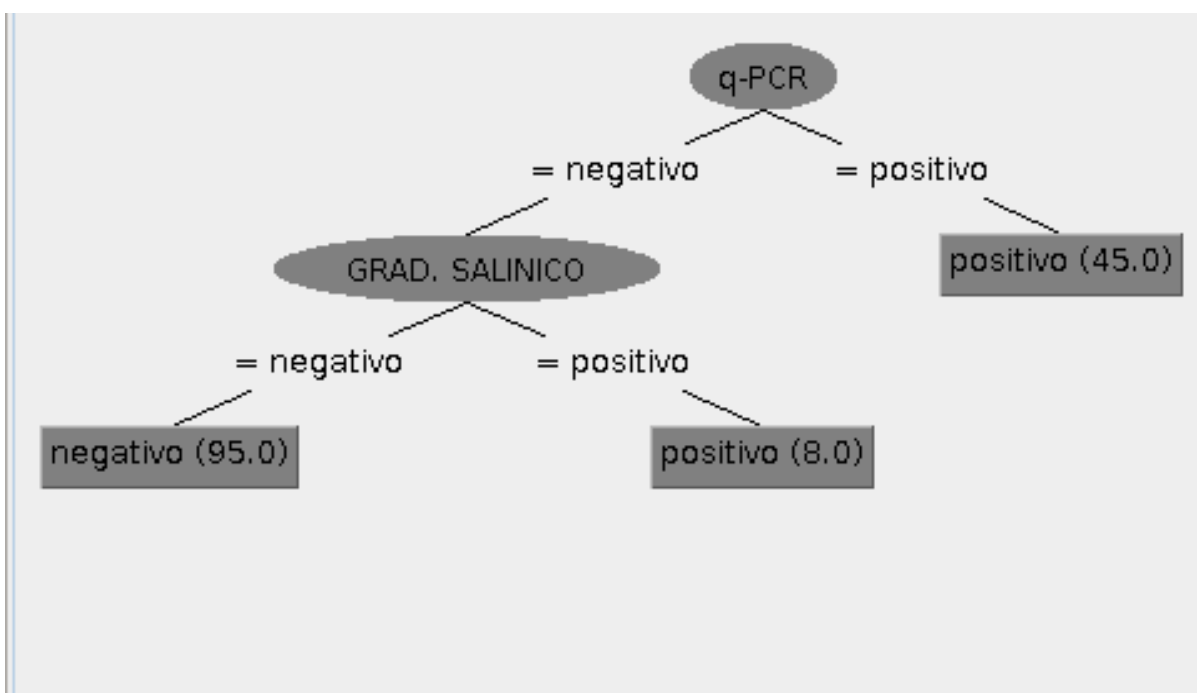


Figura 11. Árvore de decisão gerada para a localidade de Tabuas com base nos resultados de todas as técnicas diagnósticas aplicadas nas amostras de fezes de 148 indivíduos. Os atributos mais importantes para a construção desta árvore foram o ensaio de qPCR seguido pela técnica do Gradiente Salínico

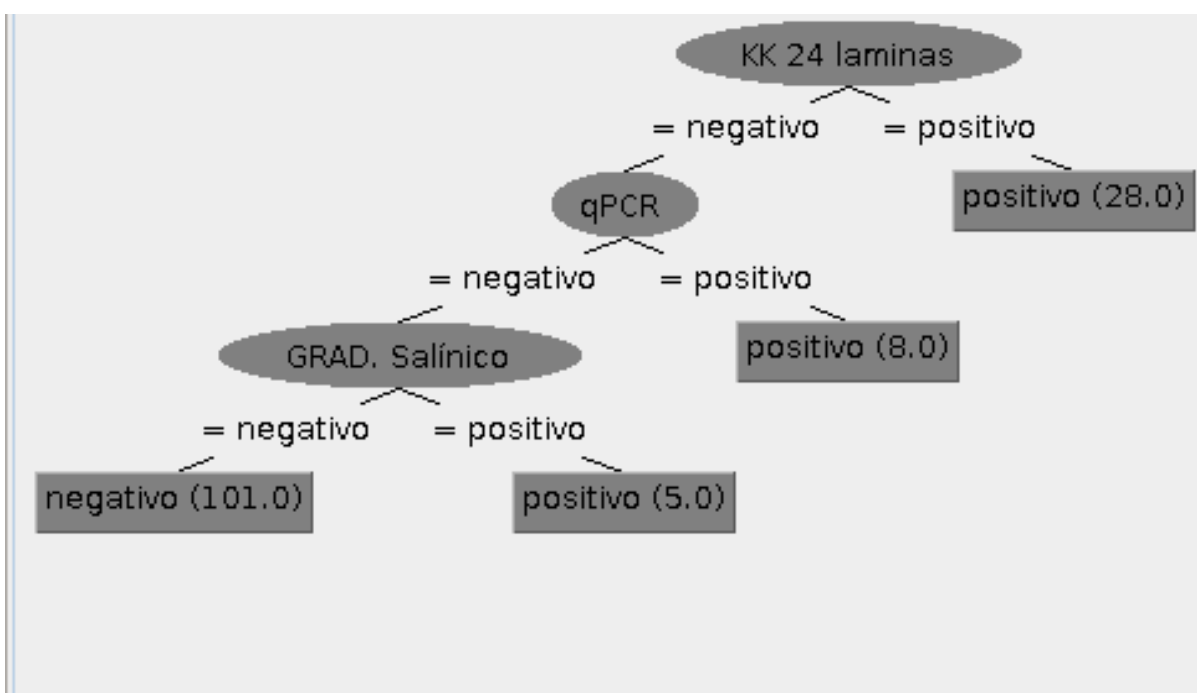


Figura 12. Árvore de decisão gerada para a localidade de Estreito de Miralta com base nos resultados de todas as técnicas diagnósticas aplicadas nas amostras de fezes de 142 indivíduos. Os atributos mais importantes para a construção desta árvore foram a técnica de Kato-Katz (24 lâminas), seguido pelo ensaio de qPCR e pela técnica do Gradiente Salínico

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari IM, Noya O. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006; 101: 29–35.

Allam AF, Kader O, Zaki A, Shehab AY, Farag HF. Assessing the marginal error in diagnosis and cure of *Schistosoma mansoni* in areas of low endemicity using Percoll and PCR techniques. *Trop Med Int Health* 2009; 14: 316–321.

Allam AF. Diagnosis of schistosomiasis in low endemic areas. In: *Schistosomiasis*, Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/diagnosis-of-schistosomiasis-in-low-endemic-areas>

Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006; 101(Suppl. I): 79-85.

Barreto ML, Smith DH, Sleigh AC. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 554-555.

Barsoum R. The kidney in schistosomiasis. In: Floege, Johnson, Feehally, editors. *Comprehensive clinical nephrology*, 4th ed. St Louis, USA: Elsevier; 2010; 654–61.

Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research* 2013; 4: 433–444.

Bergquist R, Johansen MV, Utzinger J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when?. *Trends Parasitol.* 2009; Vol. 25 N°. 4.

Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, Moore R, Habte E, Redda A, Gebre-Michael T, Gundersen SG. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 2004; 92: 205–212.

Blagg W, Schoegel EL, Mansour NS, Khalat GI. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg* 1955; 4: 23- 28.

Cavalcanti MG, Silva LF, Peralta RHS, Barreto MGM, Peralta JM. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends in Parasitology* 2013; 29 (2): 75-82.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55(4): 611–622.

Cavalcanti MG, Silva LF, Peralta RH, Barreto MG, Peralta JM. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends Parasitol* 2013; 29:75–82.

Chieffi PP, Kanamura H. Diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica. *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 1978; 30: 77-97.

Coelho PMZ, Jurberg AD, Oliveira AA, Katz N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009; Vol. 104(5): 720-723.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004; 99: 13-19.

Cunha AS. Schistosomiasis mansoni – drug therapeutic. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1992; Vol. 87, Suppl. IV, 341-351.

Davis A. Schistosomiasis. In: Cook GC, Zumla AI, editors. *Manson's Tropical Diseases*. Saunders Elsevier 2009; pp.1425–1460.

Deelder AM, Klappe HT, Van den Aardweg GJ, Van Meerbeke EH. *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. *Exp Parasitol* 1976; 40(2):189-197.

Deelder AM, Qian ZL, Kremsner PG, Acosta L, Rabello AL, Enyong P, Simarro PP, Van Etten EC, Krijger FW, Rotmans JP, et al. Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by

measurement of circulating antigens in serum and urine. Trop Geogr Med 1994; 46(4 Spec No):233-238.

De Vlas, SJ. & Gryseels, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. Parasitol Today 1992; 8: 274-277.

Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? TRENDS in Parasitology 2004; 20 (1): 35-39.

Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-To-Day Egg Count Fluctuation In *Schistosoma Mansoni* Infection And Its Operational Implications. Am J Trop Med Hyg. 1996; 54(4):319-24.

Enk MJ, Lustosa Lima AC, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ. The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. Acta Trop 2008; 108: 222–228.

Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. 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 2012; 7: (6) e38947.

Espírito-Santo MC, Alvarado-Mora MV, Dias-Neto E, Botelho-Lima LS, Moreira JP, Amorim M, Pinto PLS, Heath AR, Castilho VLP, Gonçalves EMN, Luna EJA, Carrilho FJ, Pinho JRR, Gryscek RCB. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. BMC Infectious Diseases 2014; 14:558.

Ferrari MLA, Coelho PMZ, Antunes CMF, Tavares CAP, da Cunha AS. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. Bull World Health Organ. 2003; 81(3):190-6.

GBD compare, 2010. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange. Disponível em: <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. Acesso em 19/03/2015.

Gentile R, Gonçalves MM, da Costa Neto SF, da Costa MM, Peralta RH, Peralta JM. 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* 2011; 180(3-4): 243-9.

Gomes AL, Melo FL, Werkhauser RP, Abath FG. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:133–136.

Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Coelho PMZ, Rabello A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (8): 1194-1196.

Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Oliveira MC, Coelho PMZ, Rabello, A. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of *Schistosoma* Infection in Feces. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(4).

Gonçalves MML, Barreto MGM, Peralta RHS, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja RP, Soares MS, Peralta JM. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Trop* 2006; 100: 24–30.

Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBF, Valar C, Moraes C, Garrido CT, Amaral RS. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian state, Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999; 94:9-10.

Grenfell R, Harn D, Tundup S, Da'dara A, Siqueira L, Coelho PMZ. New Approaches with Different Types of Circulating Cathodic Antigen for the Diagnosis of Patients with Low *Schistosoma mansoni* Load 2013; *Plos Neglected Tropical Diseases* 7 (2): e2054.

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

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

Hoffman VA, Pons JS, Janer JL. Sedimentation concentration method in the schistosomiasis mansoni. P. R. J. Public Health Trop. Med 1934; 9: 283-298.

Hussein HM, El-Tonsy MM, Tawfik RA, Ahmed SA. Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum. Parasitol Res. 2012; 111 (1):475-8.

Jin YM, Lu K, Zhou WF, Fu ZQ, Liu JM, et al. (2010) Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis. Clin Vaccine Immunol 17:476-480.

Jurberg AD, Oliveira AA, Lenzi HL, Coelho PMZ. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2008; 103: 112-114.

Kanamura HY, Dias LCS, Glasser CM, Silva RM, Patucci RMJ, Chiodelli SG, Addis DG. Detection of IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of the dynamics of schistosomiasis transmission in an endemic area with low worm burden. Rev Inst Med Trop São Paulo 1998; 40: 225-231.

Kato K, Miura M. Comparative examinations. Jap J Parasitol 1954; 3: 35.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A Simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop São Paulo 1972; 14: 397-400.

Katz N. Controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. In: Reis FA, Faria I & Katz N, organizadores. Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica, 1986; vol. 14. P. 51-66, Belo Horizonte: Academia Mineira de Medicina. (Suplementos dos Anais de 1983/84 da Academia Mineira de Medicina).

Katz N. Schistosomiasis Control in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998; Vol. 93, Suppl. I: 33-35.

King CH. Toward the elimination of schistosomiasis. N Engl J Med 2009; 360: 106–109.

Kongs A, Marks G, Verlé P, Van der Stuyft, P. Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections. Trop Med Int Health 2001; 6 (3): 163-169.

Lambertucci JR, Silva LC, do Amaral RS. Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40: 574-581.

Lin DD, Liu JX, Liu YM, Hu F, Zhang YY, Xu JM, Li JY, Ji MJ, Bergquist R, Wu GL, Wu HW. Routine Kato–Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: A case study in an endemic area of the People's Republic of China. Parasitol Int. 2008; 57: 281–286.

Liu LX, Qiong C, Fan XL. Recent Advances in Antischistosomal Drugs and Agents. Mini Rev Med Chem. 2013.

Lutz A. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1919; 11: 121-155.

McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis. Clin Microbiol Rev 2008; 21(1): 225–42.

Ministério da Saúde. Controle da Esquistossomose. Diretrizes Técnicas. Brasília, 1998.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, SVS, 7ª Edição, Brasília, 2009.

Ministério da Saúde. Plano Integrado Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011–2015. Brasília: Ministry of Health; 2012.

Nascimento GL, De Oliveira MRF. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 107: 1-8.

Office International des Epizooties (OIE). World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres). 5th ed. Paris: OIE, 2010. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00082.htm.

Oliveira EJ, Kanamura HY, Takei K, Hirata RD, Valli LC, et al. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102:360-366.

Oliveira LM, Santos HL, Gonçalves MM, Barreto MG, Peralta JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68(4):416-421.

Polman K, Engels D, Fathers L, Deelder AM, Gryseels B. Day-to-day fluctuation of schistosome circulating antigen levels in serum and urine of humans infected with *Schistosoma mansoni* in Burundi. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(1):150-154.

Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and faeces. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 157–162.

Pontes LA, Oliveira MC, 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* 2003; 68: 652–656.

Rabello A. Diagnosing Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1997; Vol. 92(5): 669-676.

Rabello A, Pontes LA, Dias-Neto, E. Recent Advances in the Diagnosis of *Schistosoma* Infection: the Detection of Parasite DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002; Vol. 97(Suppl. I): 171-172.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

Sarvel AK, Oliveira AA, Silva AR, Lima AC, Katz N. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(3):e990.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 411–25.

Siqueira LMV, Coelho PM, de Oliveira AA, Massara CL, Carneiro NF, Lima AC, Enk MJ. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(7):844-850.

Teixeira CF, Neuhauss E, Bem R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; Vol 1(2): e73.

Teles HMS, Ferreira CS, Carvalho ME, Zacharias F, Magalhães LA. Eficiência do diagnóstico coproscópico de *Schistosoma mansoni* em fezes prensadas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(4): 503-507.

ten Hove RJ, Verweij JJ, 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 fecal samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008, 102:179–185.

Turner P, Laloo K, Bligh J, Armstrong M, Whitty CJ, et al. (2004) Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. *J Clin Pathol* 57:1193-1196.

Utzinger J, Booth M, N'Goran EK, Muller I, Tanner M, Lengeler C. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitol* 2001; 122: 537-544.

Utzinger J, N'Goran EK, Caffrey CR, Keiser J. From innovation to application: Social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. *Acta Tropica* 2011; 120(1):S121–S137.

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Caspar W. N. Looman, Nico J. D. Nagelkerke, J. Dik F. Habbema and Dirk Engels. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; 89: 125-139.

Willis H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med J Australia* 1921; 29: 375-376.

Wichmann D, Poppert S, Thien HV, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, Philippe Parola GD, Richter J, Schunk M, Stich A, Zanger P, Burchard GD, Egbert Tannich E. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis* 2013; 13:55.

World Health Organization. The control of schistosomiasis. Geneva, p.1-85. Technical Report Series, n° 830, 1993.

World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. Geneva, 14-16, 2005.

World Health Organization. Report of a WHO Informal Consultation. Elimination of schistosomiasis from low transmission areas. Salvador, Bahia, Brazil 18–19, 2008.

WHO. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87: 37–44

WHO. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2013.

Zhang YY, Luo JP, Liu YM, Wang QZ, Chen JH, Xu MX, Xu JM, Wu J, Tu XM, Wu GL, Zhang ZS, Wu HW. Evaluation of Kato–Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: A Bayesian modeling approach. *Acta Trop* 2009; 112: 16–22.

Zhou XN, Guo JG, Wu XH, Jiang QW, Zheng J, Dang H, et al. Epidemiology of schistosomiasis in the People's Republic of China, 2004. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 (10):1470–6

Zicker F, Katz N, Wolf J. Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1977; 19: 202–207.

12 APÊNDICES

12.9 APÊNDICE A

Tabela 32. Prevalência de helmintos intestinais entre os participantes da localidade Tabuas de acordo com as técnicas Kato-Katz e Gradiente Salínico

Helmintos	Kato-Katz (n)	Gradiente Salínico (n)	Prevalência (%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	08	02	5,4 (08/148)
Ancilostomídeos	16	06	10,8 (16/148)
<i>Enterobius vermicularis</i>	08	05	5,4 (08/148)
<i>Trichuris trichiura</i>	02	00	1,3 (02/148)
<i>Taenia</i> sp.	01	00	<1,0 (01/148)
<i>Hymenolepis nana</i>	00	02	1,3 (02/148)

12.10 APÊNDICE B

Tabela 33. Prevalência de helmintos intestinais entre os participantes da localidade Estreito de Miralta de acordo com as técnicas Kato-Katz e Gradiente Salínico

Helmintos	Kato-Katz (n)	Gradiente Salínico (n)	Prevalência (%)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	01	01	<1,0% (1/142)
Ancilostomídeos	14	14	9,8% (14/142)
<i>Enterobius vermicularis</i>	08	07	5,6% (8/142)
<i>Trichuris trichiura</i>	00	00	0% (0/142)
<i>Taenia</i> sp.	00	00	0% (0/142)
<i>Hymenolepis nana</i>	03	02	2,1% (03/142)

12.11 APÊNDICE C

Tabela 34. Sintomas apresentados pelos participantes positivos da localidade Tabuas após avaliação clínica

Sintomas	Pacientes com avaliação clínica	Intensidade/Frequência
Dor abdominal		
<i>sim</i>	05 (13,5%)	03 Fraca/Ocasional 01 Forte/Ocasional 01 Forte/Diária
<i>não</i>	32 (86,5%)	
Diarreia		
<i>sim</i>	01 (2,7%)	01 leve/rara
<i>não</i>	36 (97,3%)	
Fezes com sangue		
<i>sim</i>	01 (2,7%)	01 pouco/1 x mês
<i>não</i>	36 (97,3%)	
Melena		
<i>sim</i>	0	
<i>não</i>	37 (100%)	
Hematemese		
<i>sim</i>	0	
<i>não</i>	37 (100%)	
Total	37	

12.12 APÊNDICE D

Tabela 35. Sintomas apresentados pelos participantes positivos da localidade Estreito de Miralta após avaliação clínica

Sintomas	Pacientes com avaliação clínica	Intensidade
Dor abdominal		
<i>sim</i>	12 (38,7%)	02 não relatadas 02 Fraca 02 Média 03 Leve 03 Forte
<i>não</i>	19 (61,3%)	
Diarreia		
<i>sim</i>	05(16,1%)	01 não relatada 01 leve 01 forte 02 média
<i>não</i>	26 (83,9%)	
Fezes com sangue		
<i>sim</i>	01 (3,3%)	01 pouco
<i>não</i>	30 (96,7%)	
Melena e Hematemese		
<i>sim</i>	0	
<i>não</i>	31 (100%)	
Total	31	

13 ANEXOS

13.9 Artigo 01: EVALUATION OF PARASITOLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES FOR DIAGNOSIS AND ASSESSMENT OF CURE OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI IN A LOW TRANSMISSION AREA

Este artigo é resultado de experimentos realizados no 2º semestre de 2011, ano de ingresso da aluna no doutorado. Este trabalho foi realizado com amostras fecais colhidas na localidade Pedra Preta, município de Montes Claros, região norte do estado de Minas Gerais.

A importância do monitoramento de cura após intervenções terapêuticas em indivíduos diagnosticados com esquistossomose está baseada no fato de que a taxa de cura esperada para o Praziquantel varia em torno de 80 a 90% e pelo fato dos indivíduos não-curados serem responsáveis pela manutenção da transmissão em áreas endêmicas. O objetivo deste estudo foi avaliar técnicas de diagnóstico parasitológico e molecular para o monitoramento de cura após quimioterapia. Este estudo foi conduzido em uma área de baixa transmissão, Pedra Preta, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Para estabelecer a taxa de infecção, uma combinação de exames parasitológicos foi realizada. Quatro amostras de fezes de 201 indivíduos foram analisadas pelo método de Kato-Katz (18 lâminas) e pelo método parasitológico comercial TF-Test[®]. Todos pacientes com exame parasitológico positivo foram tratados com um dose única de Praziquantel, 50 mg/kg para adultos e 60 mg/kg para crianças. Para estabelecer a taxa de cura dos 72 positivos, 69 foram seguidos após 30 dias, 67 após 90 dias e 61 após 180 dias do tratamento. Para a comparação direta entre as técnicas Kato-Katz (12 lâminas ~ 500mg) e PCR-ELISA (500 mg) no estabelecimento de cura, a mesma quantidade de amostra fecal de cada participante foi analisada.

Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area

Liliane Maria Vidal Siqueira¹*, Luciana Inácia Gomes², Edward Oliveira²,
Eduardo Ribeiro de Oliveira², Áureo Almeida de Oliveira¹, Martin Johannes Enk³,
Nídia Figueiredo Carneiro⁴, Ana Rabello², Paulo Marcos Zech Coelho¹

¹Laboratório de Esquistosomose ²Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil
³Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil ⁴Centro de Controle de Zoonoses, Montes Claros, MG, Brasil

This study evaluated parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni. A population-based study was performed in 201 inhabitants from a low transmission locality named Pedra Preta, municipality of Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil. Four stool samples were analysed using two techniques, the Kato-Katz[®] (KK) technique (18 slides) and the TF-Test[®], to establish the infection rate. The positivity rate of 18 KK slides of four stool samples was 28.9% (58/201) and the combined parasitological techniques (KK+TF-Test[®]) produced a 35.8% positivity rate (72/201). Furthermore, a polymerase chain reaction (PCR)-ELISA assay produced a positivity rate of 23.4% (47/201) using the first sample. All 72 patients with positive parasitological exams were treated with a single dose of Praziquantel[®] and these patients were followed-up 30, 90 and 180 days after treatment to establish the cure rate. Cure rates obtained by the analysis of 12 KK slides were 100%, 100% and 98.4% at 30, 90 and 180 days after treatment, respectively. PCR-ELISA revealed cure rates of 98.5%, 95.5% and 96.5%, respectively. The diagnostic and assessment of cure for schistosomiasis may require an increased number of KK slides or a test with higher sensitivity, such as PCR-ELISA, in situations of very low parasite load, such as after therapeutic interventions.

Key words: *Schistosoma mansoni* - schistosomiasis - diagnosis - control - low transmission area - Brazil

Approximately 200-300 million people worldwide are infected by one of the five main species of *Schistosoma*. Of the infected, 120 million people are symptomatic and 20 million are afflicted with a severe form of the disease. Approximately 779 million people are at risk of contracting the disease (Steinmann et al. 2006) and 280,000 deaths per year are attributed to this disease and its complications (Van der Werf et al. 2003).

Schistosomiasis is an important public health problem and the development of simple, low cost and efficient diagnostic methods that may be used on a mass scale, especially in field work, is of fundamental interest. However, decisions about individual treatment, the study of morbidity due to schistosomiasis, the rapid identification of communities at risk of infection, evaluations of cure or reinfection after chemotherapy and the monitoring of control programs are actions that depend primarily on the results of more accurate and effective diagnostic tests (Utzinger 1999).

The conventional diagnosis of *S. mansoni* infection is performed using the microscopic detection of parasite eggs in faeces. The Kato-Katz (KK) technique is rec-

ommended because it is quantitative, low cost and easy to perform (WHO 1993). However, difficulties arise in individuals with low worm burden because of the small number of eggs shed in the faeces, daily variations of oviposition by female worms and only a small amount of sample is examined in a single slide, approximately 41.7 mg of faeces (Kongs et al. 2001). Many schistosomiasis control programs adopted this procedure, which results in an underestimation of true disease prevalence, particularly in low transmission areas and individuals with low worm burdens (Enk et al. 2008). It is scientifically well demonstrated that the presence of *S. mansoni* eggs in a faeces sample varies more on different days than between various slides, which indicates that the results of a larger number of faecal examinations would be ideal to more accurately evaluate infection prevalence (Utzinger et al. 2001). Therefore, the possibility of false negative results cannot be excluded by negative stool examinations performed using only a few samples and slides.

Advances in disease diagnosis are not satisfactory despite increased awareness of the disease. This decrement is reflected in the effectiveness of control programs, which has become a major public health challenge that requires innovative and more effective strategies, such as the use of alternative diagnostic methodologies that would enable estimates of prevalence rates that are closer to reality (Enk et al. 2008).

Assays for the detection of antibodies and antigens are promising strategies that are complementary to the traditional parasitological examination. These methods are auxiliary assays that can determine therapeutic re-

doi: 10.1590/0074-02760140375

Financial support: FAPEMIG, CAPES, CNPq, FIOCRUZ

* Corresponding author: liliane_siqueira@cpqrr.fiocruz.br

Received 10 October 2014

Accepted 26 January 2015

sponses and the persistence of infection, but they are not used in population surveys, because sophisticated laboratory infrastructure is required and the majority of tests are in the validation process. Moreover, diagnostic strategies must be combined when these assays are used in low endemic areas to obtain a better estimate of the infection rate of *Schistosoma* in populations that are at risk of the disease and evaluate the effectiveness of interventions, such as chemotherapy (Cavalcanti et al. 2013).

Commercially available immunological tests include ELISA kits and indirect haemagglutination for the detection of antibodies. Recently, the Point-of-Care (POC-CCA[®]) test was evaluated to detect circulating cathodic antigens in urine samples (Rapid Medical Diagnostics, South Africa) and this test showed better sensitivity than the KK technique (Colley et al. 2013).

Molecular methods are useful for the detection of low parasitic loads and these tests are highly sensitive for the laboratory diagnosis of infectious diseases. Recent DNA detection assays are drawing attention because their robustness, which makes these assays applicable for community and individual diagnoses of schistosomiasis mansoni. The polymerase chain reaction (PCR) technique is based on the amplification of a highly repetitive DNA sequence for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in snails (Hamburger et al. 1991) and it was adapted for the diagnosis of schistosomiasis mansoni in human faeces by Pontes et al. (2002). This work standardised and evaluated the technique in endemic areas and it detected 1 fg of *S. mansoni* DNA. The specificity of this method was demonstrated by the absence of the DNA of other helminths (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Taenia solium* and *Trichuris trichiura*), which commonly infect people in endemic areas. However, this technique requires several steps after DNA amplification, including gel electrophoresis, which limits the number of samples that can be conveniently analysed.

The same group of researchers developed a PCR-ELISA system for the detection of *Schistosoma* DNA in human faeces as an alternative approach to the diagnosis of light infections (Gomes et al. 2010). This system permits the detection of DNA amplified by PCR using an ELISA platform, which measures colorimetric intensity in a microplate reader. The proposed PCR-ELISA approach was used for the diagnosis of a population in an endemic area in Brazil and 30% were found to be infected compared with the 18% found using microscopic faecal examination. The genus specificity of PCR-ELISA was assessed using purified DNA from *S. mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma magrebowiei* and *Schistosoma rhodaini* adult worms. The advantage of PCR-ELISA compared with conventional PCR is that the combined technique uses standard equipment that is widely used for the processing of ELISAs and the reagents are easy to obtain commercially.

Therefore, this study evaluated the diagnostic performance of the KK technique plus the TF-Test[®] and the molecular assay PCR-ELISA for the laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni and assessment of cure in a low transmission area.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Study area and population - This study was performed in 2009 in the communities of Buriti Seco and Morro Grande, which pertain to Pedra Preta, a little village in a schistosomiasis endemic area of the rural region of Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil. This area was chosen because the population shows a low migration index (fixed resident population) and the infection rate in 2005 when the last treatment occurred was 12% according to data provided by the Control Centre of Diseases of Montes Claros. The populations of the two communities were included in this study, which included 201 participants, 93 women and 108 men, aged between one-96 years.

Diagnostic techniques - An in depth analysis of stool samples, including a combination of parasitological examinations, was performed before treatment to establish the infection rate. This initial analysis was called the "Reference Test". Four stool samples from all participants were collected and analysed using the Kato-Katz[®] technique [Biomanguinhos-Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), state of Rio de Janeiro, Brazil] and the commercial test TF-Test[®] (Immunoassay Com Ind Ltda, Brazil) as described by Siqueira et al. (2011). The PCR-ELISA assay was used on 500 mg of the first stool sample of each participant for comparison with the parasitological tests and evaluation of diagnostic accuracy (Fig. 1).

Kato-Katz[®] - The KK test was applied using 18 slides that were prepared as follows: 12 slides of the first sample and two slides of the second, third and fourth samples were analysed for a total of 750 mg of faeces for each participant (18 x 41.7 mg).

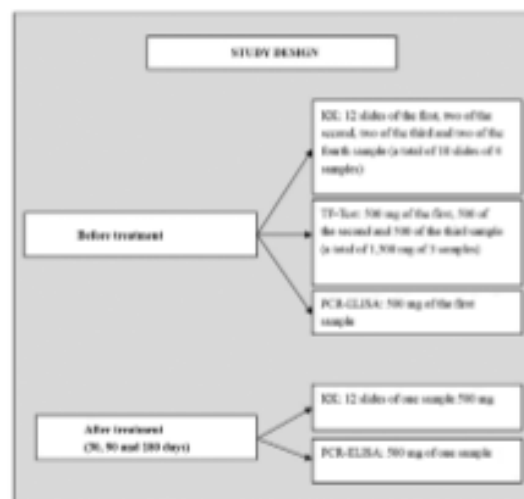


Fig. 1: flowchart of stool examinations according to different diagnostic techniques for establishing infection rate and the follow-up of positives after treatment. KK: Kato-Katz; PCR: polymerase chain reaction.

TF-Test[®] - The TF-Test[®] was performed on the first three samples using portions of 500 mg, totalling 1,500 mg of faeces, which was processed with 3 mL of ethyl acetate and one drop of detergent and centrifuged for 2 min at 500 g.

PCR-ELISA assay - DNA from 500-mg stool samples was isolated using the commercial kit QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit, following the manufacturer's recommendations (Qiagen GmbH, Germany). A 121-bp repetitive sequence of *S. mansoni* (Hamburger et al. 1991) was amplified using a forward biotinylated primer (5'-GATCTGAATCCGACCAACCG-3') and reverse primer (5'-ATATTAACGCCACGCTCTC-3'), according to the protocols described by Gomes et al. (2010). The amplicons were detected in an ELISA plate sensitised with streptavidin using a fluorescein 5'-labeled probe (5'-TG-GTTTCGGAGATACAACGA-3') with available reagents in the commercial kit PCR Plate Detection, according to the manufacturer's recommendations (Sigma, USA). All experiments were performed in duplicate and data represent the mean values. Positive controls extracted from *S. mansoni* eggs and negative controls (water and negative control of PCR) were added to each PCR-ELISA assay. The receiver operating characteristic curve (ROC) determined the cut-off value of 0.116. Individuals with a mean absorbance above the cut-off were considered positive. The human beta-actin gene was amplified using the primers Acol (5'-ACCTCATGAAGATCCTCACC-3'), biotinylated in the 5' region and Aco2 (5'-CCATCTCTGCTCGAAGTCC-3') as a control for variations in the efficiency of DNA extraction and PCR-amplification. Products were detected using a fluorescein 5'-labeled probe (5'-TCTCCTTAATGCACGCACG-3') in the PCR-ELISA system as described by Gomes et al. (2010).

One stool sample of each treated participant was analysed after treatment to establish the cure rate using the KK technique examining 12 slides per sample and the PCR-ELISA assay, which used 500 mg of the same stool sample.

Comparisons of different diagnostic approaches - Diagnostic parameters were calculated using three different approaches for comparison; (i) two-slide KK examination, which is the current recommendation of the Brazilian Ministry of Health for the national schistosomiasis control program, (ii) 12-slide KK examinations to observe the diagnostic parameters using the same amount of faecal material and (iii) the Reference Test described above as an approximation of the real infection rate to evaluate test performance.

Statistical analysis - The software OpenEpi, v.3.03 (Dean et al. 2014) was used for statistical analyses. Co-positivity and co-negativity values were calculated with 95% confidence intervals (CI) for each of the three approaches. The level of diagnostic agreement between different diagnostic techniques was determined using the kappa coefficient. Landis and Koch (1977) demonstrated poor concordance when this coefficient was lower than 0.20, weak concordance between 0.21-0.40, moderate concordance between 0.41-0.60, good concordance between 0.61- 0.80 and excellent concordance when higher than 0.81.

Treatment of positives - All participants who were positive for schistosomiasis as detected using the parasitological techniques were treated with a single dose of 60 mg/kg praziquantel for children and 50 mg/kg for adults. Infections with other helminths were treated using a single dose of 400 mg albendazole, as proscribed by the Brazilian Ministry of Health.

Cure assessment - Cure assessments were performed 30, 90 and 180 days post-treatment. Sixty-nine of the 72 positive patients were followed up 30 days after treatment, 67 patients were followed up after 90 days and 61 patients were followed up after 180 days. One stool sample from each participant was analysed using the KK technique (12 slides per sample) and the PCR-ELISA assay, which was applied to 500 mg of the same stool sample.

Ethics - The Ethical Research Committee of the Research Centre René Rachou/Fiocruz (CEPSH/CPQRR. 03/2008) and the National Brazilian Ethical Board (Scientific Opinion 784/2008, CONEP 14886) approved this study. The objectives of this study were presented and explained to all participants and written consent was obtained from each individual, who signed a form prior to enrolment in this study.

RESULTS

Seventy-two of the 201 stool samples examined were positive using the Reference Test. Two-slide KK examination of the same sample, which is the current recommendation of the Brazilian Ministry of Health for the national schistosomiasis control program, detected 16 positives (8%), examination of 12 KK slides detected 29 positives (14.4%), 18 KK slides detected 58 positives (28.9%), 32 positives (15.9%) were detected using the TF-Test[®] and 47 positives (23.4%) were detected using PCR-ELISA (Fig. 2). The comparison of PCR-ELISA with two KK slides, which corresponded to 83.4 mg of faeces, revealed that the co-positivity of PCR-ELISA was 93.75% (CI: 71.67-98.89%) and the co-negativity was 82.7% (CI: 76.6-87.47). The comparison with 12 KK slides of the same sample, which corresponded to 500 mg of faeces (41.7 mg x 12 = 500 mg), demonstrated a co-positivity of PCR-ELISA of 89.66% (CI: 73.61-96.42%) and a co-negativity of 87.8% (CI: 82.06-91.87%) (Table I).

Out of 47 positives detected by PCR-ELISA using 500 mg of the first sample, 12 were not identified by the Reference Test. Thirty-seven positives only were detected by the Reference Test, however the first assay was achieved with a single sample and the parasitological combination with four samples.

The kappa index was calculated to evaluate agreement among the methods. Two KK slides showed moderate agreement with PCR-ELISA (kappa index of 0.405) and 12 slides showed a substantial agreement (kappa index of 0.616) (Table II). The PCR-ELISA assay showed moderate agreement with the Reference Test (kappa index of 0.426) (Table III).

The cure rate 30 days after treatment using the KK technique was 100% and one positive individual was detected using PCR-ELISA (cure rate of 98.5%). Three positive individuals were detected using PCR-ELISA 90 days

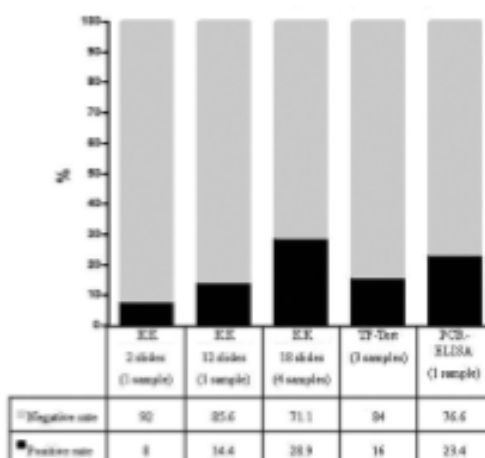


Fig. 2: diagnostic performance of parasitological and molecular techniques using stool samples, Pedra Preta, municipality of Montes Claros, state of Minas Gerais, Brazil, 2009. KK: Kato-Katz; PCR: polymerase chain reaction.

TABLE I

Results of co-positivity and co-negativity for polymerase chain reaction (PCR)-ELISA in relation to two Kato-Katz (KK) slides and in direct comparison with 12 KK slides for the detection of infection with *Schistosoma mansoni*

KK positivity rates % (n/n)	PCR-ELISA % (n/n)	
	Co-positivity	Co-negativity
8 (16/201) (2 slides = 83.4 mg)	93.7 (15/16)	82.7 (153/185)
14.4 (29/201) (12 slides = 500 mg)	89.7 (26/29)	87.8 (151/172)

after treatment (cure rate of 95.5%), but these patients were not identified using analysis of 12 KK slides. The cure rate 180 days after treatment was 98.4% using KK (1 out of 61) and 96.5% using PCR-ELISA (2 out of 61), with a final cure rate of 95.1% (3 out of 61) (Table IV).

DISCUSSION

Evaluations of PCR-ELISA assay showed promising results. This assay proved a valuable tool for the diagnosis of schistosomiasis despite its relatively high cost. PCR-ELISA can be applied to comparisons between diagnostic methods and it is very useful to confirm suspicious cases that were not detected using conventional parasitological methods and evaluate cure control after chemotherapeutic treatment.

The PCR technique is widely used for the diagnosis of several human diseases, but its application in neglected diseases, especially schistosomiasis, were explored only recently. Pontes et al. (2002) first described the use of PCR in faecal samples for the diagnosis of schistosomiasis. Some authors obtained high sensitivity and specificity (Pontes et al. 2003, Allam et al. 2009) compared to routine parasitological examinations, such as the KK technique (Katz et al. 1972).

The positivity rate detected using PCR-ELISA was 23.4% in the present study, which was higher than the 14.4% using KK technique (12 slides). However, three participants who exhibited shedding eggs in faeces (diagnosed using the KK technique) were not identified using PCR-ELISA, which may be explained by the absence of eggs in the samples examined by PCR assay, the presence of *Taq* DNA polymerase enzyme inhibitors or failure in extraction, although the positive internal control (human beta-actin gene) was detected in these samples. Further, the DNA from these negative PCR-ELISA samples were diluted 1:10, 1:20 and 1:40 and assayed again to exclude the possibility of inhibiting the reaction, but the results were identical to the initial assay.

PCR-ELISA detected 20 positive cases that were not identified using the KK technique (12 slides). Our data corroborate the findings of Allam et al. (2009) who

TABLE II

Comparison and agreement between results detected by the polymerase chain reaction (PCR)-ELISA in relation to Kato-Katz (KK) method using two and 12 slides of the same stool sample

		KK (2 slides = 83.4 mg)			KK (12 slides = 500 mg)		
		Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
PCR-ELISA (500 mg of the 1st sample)	Positive	15	32	47	Positive	26	47
	Negative	1	153	154	Negative	3	151
Total		16	185	201		29	172
		Kappa index: 0.405			Kappa index: 0.616		

TABLE III
Comparison and agreement between results detected by the Reference Test* and polymerase chain reaction (PCR)-ELISA*

		Reference Test		Total
		Positive	Negative	
PCR-ELISA (500 mg of the 1st sample)	Positive	35	12	47
	Negative	37	117	154
Total		72	129	201

Kappa = 0.426

*: four samples = 18 slides of Kato-Katz + TF-Test[®]; †: single sample.

showed that PCR detected 23% positive cases amongst negative samples for *S. mansoni* using the KK technique from individuals living in a hypoendemic area. Similar results were found by Rabello et al. (2002) and by Pontes et al. (2003) using conventional PCR and visualisation on gel electrophoresis. These authors reported that 16 out of 194 participants exhibited positive PCR, but did not present eggs in faeces, whereas two positive participants using the KK method were negative using PCR. Pontes et al. (2003) explained that the positive cases that were not detected using PCR could occur during the DNA amplification reaction as a result of various factors, such as amplification inhibition by faecal compounds, DNA degradation during transportation from the field to the laboratory or the absence of eggs in the sample examined.

A study by Gomes et al. (2010) demonstrated that PCR-ELISA assay analysis of stool samples from 206 individuals from an endemic area compared with 12 KK slides from a single sample revealed a sensitivity of 97.4% and specificity of 85.1%, which are higher than the values in our study. This difference may be explained by factors that are inherent in the experimental procedures,

which may generate errors related to the detection of parasite DNA, its degradation during biological sample collection or absence in the sample analysed. The need for well-trained technicians who rigorously apply quality control measures at all stages of the reaction should be stressed to avoid false-negative or false-positive results from contamination.

Molecular methods may suffer a loss of standardisation (reproducibility) and strength when "in house" techniques are used. These criteria are required for the possible application of these methods in control programs (Gomes et al. 2009). Faecal samples are difficult to use for molecular analyses. The commercial kit QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit was used in this study for DNA extraction from stool to avoid methodological interferences in the procedure. Physical methods (e.g., separation of rooms and materials and the use of laminar flow hood with ultraviolet light) were utilised throughout the experiment to minimise the chances of sample contamination. This technique requires laboratory infrastructure and a more complex operating engagement. Therefore, it is indicated for diagnosis of *Schistosoma* spp in special situations, when high sensitivity and specificity are required and infrastructure is available (Rabello et al. 2002).

A greater number of parasitic infections with low viral load are detected using diagnostic methods with increased sensitivity. Seventy of the 72 (97.2%) individuals infected by *S. mansoni* presented low worm burden [1-100 eggs per gram (epg)], one individual showed medium parasite burden (156 epg) and another patient showed a high intensity of infection (555 epg) as evaluated using the Reference Test.

The assessment of cure after treatment using the KK technique and PCR-ELISA assay showed a decrease of infected individuals. Different reasons may explain the differences in cure rates between these techniques. For example, DNA from dead worms or eggs remaining in tissues can be excreted in faeces for a period of time after treatment. Another reason is that the sensitivity of the PCR-ELISA for the detection of low parasite burdens is greater than the KK technique (Wichmann et al. 2013). The lower cure rate six months after treatment may be explained by the temporary interruption of the oviposi-

TABLE IV
Assessment of cure 30, 90 and 180 days after treatment by the Kato-Katz (KK) and polymerase chain reaction (PCR)-ELISA techniques

Techniques	Cure rate % (n/n)		
	30 days	90 days	180 days
KK (12 slides = 500 mg)	100 (69/69)	100 (67/67)	98.4 (60/61)
PCR-ELISA (500 mg)	98.5 (68/69)	95.5 (64/67)	96.5 (59/61)

tion by female worms as a result of treatment and a resumption of oviposition at a later time. These individuals also may have been re-infected because of the constant exposure they may suffer in the endemic areas.

Managers of control programs in areas of low transmission must choose between the KK technique with various samples or PCR-ELISA assay to detect the largest number of infected individuals using a single sample. Notably, the first technique is less expensive, but the latter technique is more accurate. The cost of PCR reagents is US \$10 per faecal sample (Gomes et al. 2010), but these costs are greatly reduced when the technique is utilised on a large scale. PCR also provides good precision (reproducibility and repeatability), is genus-specific and may estimate worm burden, which correlates with the values of egg of faeces determined using the KK technique.

The results obtained using PCR-ELISA support the development of a promising diagnostic method that only uses a faecal sample. This technique represents an important step forward to support studies on epidemiology and disease control, especially when the cost would be reduced by the use of industrial scale production. The assessment of cure in situations of very low parasite load, such as after therapeutic interventions, may require increased numbers of KK slides or a test with higher sensitivity than PCR-ELISA. This study also demonstrated a low positivity rate during follow-up after treatment, which indicates that an in-depth diagnostic survey is more effective and it may likely prevent successive treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Vera de Paula Ribeiro, from the Laboratory of Schistosomiasis, CPqRR, to referees review of the English, for the cooperation of the technical team of the Control Centre of Diseases of Montes Claros, and to the population of Pedra Preta, for their collaboration during the field work.

REFERENCES

- Allam AF, Kader O, Zaki A, Shehab AY, Farag HF 2009. Assessing the marginal error in diagnosis and cure of *Schistosoma mansoni* in areas of low endemicity using Percoll and PCR techniques. *Trop Med Int Health* 14: 316-321.
- Cavalcanti MG, Silva LF, Peralta RHS, Barreto MGM, Peralta JM 2013. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends Parasitol* 29: 75-82.
- Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tehsam Tehsani LA, N'Goran EK, Erko B, Karanja DM, Kabeteine NB, van Lieshout L, Rathbun S 2013. A five-country evaluation of a Point-of-Care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 88: 426-432.
- Dean AG, Sullivan KM, Soe MM 2014. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Available from: OpenEpi.com.
- Enk MJ, Lustosa Lima AC, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ 2008. The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop* 108: 222-228.
- Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Coelho PMZ, Rabello A 2009. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1194-1196.
- Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Oliveira MC, Coelho PMZ, Rabello A 2010. Developments and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e664.
- Hamburger J, Turstski T, Kapeller I, Deresiewicz R 1991. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species specific probe. *Mol Biochem Parasitol* 44: 73-80.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14: 397-400.
- Kongs A, Marks G, Verle P, Van der Stuyf P 2001. Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections. *Trop Med Int Health* 6: 163-169.
- Landis JR, Koch GG 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- Postes LA, Dias-Neto E, Rabello A 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and faeces. *Am J Trop Med Hyg* 66: 157-162.
- Postes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 652-656.
- Rabello A, Postes LA, Dias-Neto E 2002. Recent advances in the diagnosis of *Schistosoma* infection: the detection of parasite DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (Suppl. 1): 171-172.
- Siqueira LMV, Coelho PMZ, de Oliveira AA, Massara CL, Carneiro NFF, Lima ACL, Enk MJ 2011. 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* 106: 844-850.
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6: 411-425.
- Utzinger J 1999. *Novel approaches in the control of schistosomiasis: from rapid identification to chemoprophylaxis*, PhD Thesis, University of Basel, Basel, 202 pp.
- Utzinger J, Booth M, N'Goran EK, Müller I, Tanner M, Lengeler C 2001. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitol* 122: 537-544.
- Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D 2003. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 89: 125-139.
- Wichmann D, Poppert S, Von Thien H, Clorinx J, Dieckmann S, Jensenius M, Parola P, Richter J, Schunk M, Stich A, Zanger P, Burchard GD, Tammich E 2013. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis* 13: 55.
- WHO - World Health Organization 1993. The control of schistosomiasis. *Tech Rep Ser* 830: 1-85.


13.10 Check-list do guia de diretrizes STARD para estudos de avaliação de acurácia diagnóstica

Seção e Tópicos	Item		Check-list
TITULO/RESUMO/ PALAVRAS- CHAVE	1	Identificar o artigo como um estudo de acurácia diagnóstica (recomendado usar os termos sensibilidade e especificidade).	✓
INTRODUÇÃO	2	Afirmar a questão de pesquisa ou objetivo do estudo, tais como estimar a acurácia diagnóstica ou comparar a acurácia entre dois testes ou entre grupos de participantes.	✓
MÉTODOS			
<i>Participantes</i>	3	Descrever a população de estudo: Critérios de inclusão e exclusão, locais onde os dados foram coletados.	✓
	4	Descrever o recrutamento dos participantes: O recrutamento baseou-se na apresentação de sintomas, nos resultados de testes prévios, ou no fato de que os participantes tinham recebido o teste índice ou o de referência?	✓
	5	Descrever a seleção dos participantes: A população de estudo é uma série consecutiva de participantes definidos pelos critérios de seleção nos itens 3 e 4? Se não, especificar como os participantes foram posteriormente selecionados.	✓
	6	Descrever a coleta de dados: A coleta de dados foi planejada previamente a realização dos testes índice e de referência (estudo prospectivo) ou após (retrospectivo)?	✓
<i>Testes</i>	7	Descrever o padrão de referência e seus fundamentos	✓
	8	Descrever as especificações técnicas do material e métodos envolvidos, incluindo como e quando as	✓

		medidas foram realizadas, e/ou citar as referências para o teste índice e de referência.	
	9	Descrever a definição e fundamentos para as unidades, pontos de corte e/ou categorias dos resultados do teste índice e de referência.	✓
	10	Descrever o número, treinamento, experiência das pessoas que executam a leitura dos testes (índice e referência).	
	11	Descrever se os examinadores dos testes índice e referência realizaram os testes às cegas (mascarado) frente aos resultados de outros testes e não dispunha de nenhuma outra informação clínica.	✓
<i>Métodos estatísticos</i>	12	Descrever métodos para calcular ou comparar medidas de acurácia diagnóstica e métodos estatísticos usados para quantificar incerteza (ex: Intervalos de confiança de 95%)	✓
	13	Descrever os métodos para calcular a reprodutibilidade, se realizada.	✓
RESULTADOS			
<i>Participantes</i>	14	Relatar quando o estudo foi realizado, incluindo datas de início e fim do recrutamento.	✓
	15	Relatar características clínicas e demográficas (idade, sexo, espectro de gravidade dos sintomas, comorbidade, tratamentos atuais e centros de recrutamentos).	✓
	16	Relatar o número de participantes que satisfazem o critério de inclusão que realizaram e não realizaram os testes índice e/ou o padrão de referência; descrever porque os participantes falharam em receber cada um destes testes (um diagrama de fluxo é fortemente recomendado).	✓
<i>Resultados dos</i>	17	Relatar o intervalo de tempo entre os testes índice e padrão, e qualquer tratamento administrado entre eles.	✓

<i>testes</i>			
	18	Relatar distribuição de gravidade da doença (critérios de definição) naqueles com a condição alvo; outros diagnósticos em participantes sem a condição alvo.	✓
	19	Relatar a tabulação cruzada dos resultados do teste índice (incluindo resultados indeterminado e perdido) pelos resultados do padrão de referência; para resultados contínuos relatar a distribuição dos resultados dos testes pelos resultados do padrão de referência.	✓
	20	Relatar qualquer evento adverso atribuível ao teste índice e de referência.	Não se aplica
<i>Estimativa</i>	21	Relatar as estimativas de acurácia diagnóstica e medidas de incerteza estatística (ex. intervalos de confiança 95%).	✓
	22	Relatar como os resultados indeterminados, dados perdidos e “outliers” do teste índice foram administrados.	✓
	23	Relatar as estimativas de variabilidade da acurácia diagnóstica entre sub-grupos de participantes, técnicos ou centros, se realizado.	✓
	24	Relatou as estimativas da reprodutibilidade do teste, se realizado.	Não se aplica
DISCUSSÃO	25	Discutir a aplicabilidade clínica dos achados do estudo.	✓

13.11 Ficha Clínica e Epidemiológica aplicada aos participantes positivos para *S. mansoni* das localidades Tabuas e Estreito de Miralta


 Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou

FICHA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA

Nome do Paciente _____ nº de controle _____
 Endereço Atual _____ Data ____/____/____
 Endereço Anterior _____ (só na mesma localidade)
 Naturalidade _____
 (Local - Município – Estado)
 Médico _____

1- **Dados Pessoais e Familiares** (Questionário sócio-econômico) nº ident. _____

1.1- Data de nascimento: ____/____/____
 1.2- Idade: ____ anos
 1.3- Sexo: Feminino() Masculino()
 1.4- Estado Civil: Solteiro(a) () Casado(a) () Viúvo(a) ()
 1.4- Naturalidade: Zona Urbana () Outra()
 1.5- Ocupação Individual: _____
 1.6- Lugar onde exerce a ocupação: Z. urbana() Z. rural()
 1.7- Ocupação do chefe de família: _____
 1.8- Grau de escolaridade: _____
 1.9- Tipologia da habitação: Tipo I() Tipo II() Tipo III()
 1.10- Abastecimento da água do domicílio: Encanada da rede pública()
 Outra() _____

2- Contato com águas (coleções hídricas) no últimos 60 dias nº ident. _____

2.1- Relata contato: Sim() Não()

2.2- Frequência de contatos: Diário() Semanal() Quinzenal()
Mensal ou menos()

2.3- Motivos de contatos:

Variáveis/ Motivos	CONTATO		Frequência de contato com água						
	Sim	Não	Diária	Semanal	Quinzenal	Mensal	Semestral	Anual ou Menos	Local
Buscar água									
Lavar roupa									
Lavar vasilha									
Tomar banho/higiene pessoal									
Nadar (lazer)									
Pescar									
Atravessar córrego									
Trabalho n a lavoura									
Regar horta									
Retirar areia e/ou minério									
Outros (especificar)									

2.4- Grau de contato: _____ pontos

Grau I () Grau II ()

OBSERVAÇÕES

3. Sinais e sintomas (nos últimos 30 dias) n° ident. _____

3.1. Dor abdominal: Sim () Não ()

3.1.1. Intensidade: _____

3.1.2. Frequência: _____

3.1.3. Local: Difusa () Perium. () HD () HE ()

Epig. () FI () NA ()

3.1.4. Características: Cólica () Pontada () NA ()

3.2. Diarréia: Sim () Não ()

3.2.1. Intensidade: _____

3.2.2. Frequência: _____

3.3. Fezes com sangue: Sim () Não ()

3.3.1. Intensidade: _____

3.3.2. Frequência: _____

3.4. Melena: Sim () Não ()

3.2.1. Intensidade: _____

3.2.2. Frequência: _____

3.5. Hematemese: Sim () Não ()

3.2.1. Intensidade: _____

3.2.2. Frequência: _____

3.6. Outros: Sim () especificar _____

Não ()

3.7. Assintomático: Sim () Não ()

4. Antecedentes pessoais: n° ident. _____

- 4.1. Tratamento Anterior: Sim () Não ()
- 4.2. Hematemese: Sim () Não ()
- 4.3. Esplenectomia: Sim () Não ()
- 4.4. Icterícia: Sim () Não ()
- 4.5. Alcoolismo: Sim () Não ()
- 4.6- Convulsões: Sim () Não ()
- 4.7- Antecedentes familiares: Sim () _____
 Não ()
 Desconhece()

4.1. Tratamento anterior		Tratamento Atual
1°	2°	
Droga:		
Data:		
Posologia:		
Forma de administração:		
Resultado:		
Local:		
Está em uso de outro medicamento?		Qual?
Amenorréia?	Gravidez?	Está amamentando?
Obs:		
4.3. Esplenectomia: Data e local:		
Obs:		

5. Exame Físico

nº ident. _____

5.1. Aparelho Córdio-Vascular

PA	PULSO	AUSCULTA

Obs: _____

5.2. Abdome

5.2.1. Ascite: Sim () Não ()

5.2.3. Circulação Colateral: Sim () Não ()

5.3. Fígado

5.3.1. Palpável () Não palpável ()

5.3.2. Se palpável: L. Direito _____ cm do RCE

L.. Esquerdo _____ cm do Ap. Xifóide

5.3.3. Dor à palpação: Sim () Não ()

5.3.4. Superfície: Lisa () Nodular ()

5.3.5. Consistência: Normal () Endurecida () Duro ()

5.4. Baço

5.4.1. Palpável () Não palpável ()

5.4.2. Se palpável: _____ cm do RCD

5.4.3. Dor à palpação: Sim () Não ()

5.4.4. Consistência: Normal () Endurecida () Duro ()

5.5. Forma Clínica

Tipo I ()

Tipo II ()

Tipo III ()

5.6. Apresentação Clínica

Intestinal()

Hepatointestinal()

Hepatoesplenico()

13.12 Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Comitê de Ética

MEMORANDO N°47/2013 CEP – CPqRR/ FIOCRUZ / MS

Belo Horizonte, 02 de Outubro de 2013

Para: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Laboratório de Esquistossomose
Centro de Pesquisas René Rachou
Fundação Oswaldo Cruz

De: Liléia Gonçalves Diotaluti
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos
Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz Minas / MS

Assunto: Emenda – Modificações no Protocolo de Pesquisa.

Prezado Dr. Zech Coelho,

Foi analisada a solicitação de uma nova Emenda – Modificações no Protocolo de Pesquisa, com a conclusão do Estudo até Julho de 2015, referente ao projeto intitulado "Avaliação de novas técnicas para detecção de *Schistosoma mansoni* em pacientes de áreas de baixa endemicidade", Protocolo **CEP-CPqRR nr. 03/2008**, tendo sido considerada Aprovada por este Comitê de Ética. Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios parciais e final.

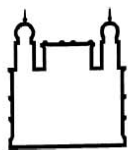
Atenciosamente,



Liléia Diotaluti
Vice-Coordenadora do CEP - CPqRR

Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - 30190-002, Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: 51 3349-7825 Fax: 51 3349-7825 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

13.13 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Esquistossomose

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis por menores de idade

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: *“Aprimoramento e validação de novos métodos diagnósticos para esquistossomose mansoni em áreas endêmicas de baixa transmissão, antes e após intervenção terapêutica”*:

Equipe responsável:

Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.
Naftale Katz (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.
Nídia Francisca de Figueiredo Carneiro (Secretaria de Saúde de Montes Claros) – Tel.: (38) 8823 2636.

Para maiores esclarecimentos entre em contato conosco.

- Informações Gerais:

A Esquistossomose (xistose, barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. Em alguns casos pode produzir barriga d’água e sangramentos (no vômito e nas fezes). Estes casos felizmente são raros porque hoje existem medicamentos que curam a maioria dos doentes. Você foi selecionado porque sua localidade apresentou casos da doença e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

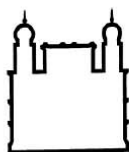
- Descrição da Pesquisa

Objetivos: O presente estudo visa aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas (exame de sangue) para o diagnóstico e controle de cura após tratamento com Praziquantel (remédio em uso no Brasil).

Descrição do Estudo: Serão colhidas amostras das fezes, urina e também serão colhidas pequenas quantidades de sangue (10 ml) antes e após o tratamento. Os exames de fezes irão detectar os ovos dos vermes com mais precisão, podendo facilitar assim, futuramente, o controle da transmissão das doenças. Os exames de sangue e de urina têm como propósito detectar anticorpos e antígenos (substâncias específicas no sangue) e DNA (traços do parasito na urina) que ajudam a reforçar o diagnóstico da doença e confirmam a cura após o tratamento.

Benefícios: Os participantes que apresentarem infecção detectada pelo exame de fezes serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, no caso de xistose e com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Serão também dadas noções de higiene com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (+55) (31) 3349 7740 - Fax: (+55) (31) 3295-3115
E-mail: coellhopm@cpqrr.fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas René Rachou
 Laboratório de Esquistossomose

Riscos em potencial: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses.

Permissão para revisão dos dados (confidencialidade): As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP - CPqRR, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Entendimento por parte dos participantes: Eu pude fazer todas as perguntas relacionadas ao presente projeto e autorizo a equipe de pesquisadores acima relacionados a me incluir ou aquele(s) que estão sob a minha responsabilidade, na presente pesquisa. Estou ciente que a qualquer momento poderei interromper minha participação no projeto sendo garantida à assistência médica necessária. Posso, a qualquer momento, discutir questões relacionadas aos meus direitos, relativas a qualquer aspecto do presente projeto durante ou após sua execução.

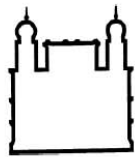
Consentimento: Com base no exposto, estou ciente dos procedimentos que serão realizados durante este estudo e concordo em participar voluntariamente do mesmo, (autorizo também a participação do menor mencionado). Tenho conhecimento da importância da minha cooperação e do meu compromisso com o sucesso da pesquisa. Sendo assim, autorizo os pesquisadores a marcarem os exames e tratamentos relacionados à pesquisa e me contactarem, conforme o andamento do projeto.

Se houver um compromisso ao qual não possa comparecer avisarei com antecedência.

_____	_____
Nome do responsável	Ass. do responsável
_____	_____
Nome do participante menor de idade	Ass. do participante menor de idade (quando cabível)
_____	_____
Nome do pesquisador	Ass. do pesquisador

→ Para maiores esclarecimentos, em caso de necessidade e/ou eventos adversos relacionados à sua participação na pesquisa, entre em contato com o CEP - CPqRR (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825 – Email: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (+55) (31) 3349 7740 - Fax: (+55) (31) 3295-3115
 E-mail: coelhohp@cpqrr.fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Esquistossomose

Termo de Assentimento Livre Esclarecido
para menores de idade

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: *“Aprimoramento e validação de novos métodos diagnósticos para esquistossomose mansoni em áreas endêmicas de baixa transmissão, antes e após intervenção terapêutica”*:

Equipe responsável:

Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.

Naftale Katz (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.

Nídia Francisca de Figueiredo Carneiro (Secretaria de Saúde de Montes Claros) – Tel.: (38) 8823 2636.

Para maiores esclarecimentos entre em contato conosco.

- Informações Gerais:

A Esquistossomose (xistose, barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. Em alguns casos pode produzir barriga d’água e sangramentos (no vômito e nas fezes). Estes casos felizmente são raros porque hoje existem medicamentos que curam a maioria dos doentes. Você foi selecionado porque sua localidade apresentou casos da doença e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

- Descrição da Pesquisa

Objetivos: O presente estudo visa aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas (exame de sangue) para o diagnóstico e controle de cura após tratamento com Praziquantel (remédio em uso no Brasil).

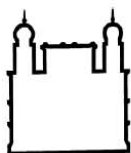
Descrição do Estudo: Serão colhidas amostras das fezes, urina e também serão colhidas pequenas quantidades de sangue (10 ml) antes e após o tratamento. Os exames de fezes irão detectar os ovos dos vermes com mais precisão, podendo facilitar assim, futuramente, o controle da transmissão das doenças. Os exames de sangue e de urina têm como propósito detectar anticorpos e antígenos (substâncias específicas no sangue) e DNA (traços do parasito na urina) que ajudam a reforçar o diagnóstico da doença e confirmam a cura após o tratamento.

Benefícios: Os participantes que apresentarem infecção detectada pelo exame de fezes serão tratados gratuitamente com praziquantel ou oxamniquine, no caso de xistose e com albendazol ou mebendazol em caso de outras verminoses. Serão também dadas noções de higiene com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: (+55) (31) 3349 7740 - Fax: (+55) (31) 3295-3115

E-mail: coelhohp@cpqrr.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Esquistossomose

Riscos em potencial: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses.

Permissão para revisão dos dados (confidencialidade): As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP - CPqRR, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Entendimento por parte dos participantes: Eu pude fazer todas as perguntas relacionadas ao presente projeto e autorizo a equipe de pesquisadores acima relacionados a me incluir ou aquele(s) que estão sob a minha responsabilidade, na presente pesquisa. Estou ciente que a qualquer momento poderei interromper minha participação no projeto sendo garantida à assistência médica necessária. Posso, a qualquer momento, discutir questões relacionadas aos meus direitos, relativas a qualquer aspecto do presente projeto durante ou após sua execução.

Consentimento: Diante do que foi dito, estou ciente dos procedimentos que serão realizados durante este estudo e concordo em participar voluntariamente do mesmo. Tenho conhecimento da importância da minha cooperação e do meu compromisso com o sucesso da pesquisa. Sendo assim, autorizo os pesquisadores a marcarem os exames e tratamentos relacionados à pesquisa e me contactarem, conforme o andamento do projeto.

Se houver um compromisso ao qual não possa comparecer avisarei com antecedência.

Nome do responsável pelo (a) menor de idade

Ass. do responsável pelo (a) menor de idade

Nome do (a) menor de idade

Ass. do (a) menor de idade (quando cabível)

Nome do pesquisador

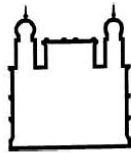
Ass. do pesquisador

→ Para maiores esclarecimentos, em caso de necessidade e/ou eventos adversos relacionados à sua participação na pesquisa, entre em contato com o CEP - CPqRR (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825 – Email: cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: (+55) (31) 3349 7740 - Fax: (+55) (31) 3295-3115

E-mail: coelhohp@cpqr.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Esquistossomose

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: *“Aprimoramento e validação de novos métodos diagnósticos para esquistossomose mansoni em áreas endêmicas de baixa transmissão, antes e após intervenção terapêutica”*:

Equipe responsável:

Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.

Naftale Katz (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.

Nídia Francisca de Figueiredo Carneiro (Secretaria de Saúde de Montes Claros) – Tel.: (38) 8823 2636.

Para maiores esclarecimentos entre em contato conosco.

- Informações Gerais:

A Esquistossomose (xistose, barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. Em alguns casos pode produzir barriga d’água e sangramentos (no vômito e nas fezes). Estes casos felizmente são raros porque hoje existem medicamentos que curam a maioria dos doentes. Você foi selecionado porque sua localidade apresentou casos da doença e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

- Descrição da Pesquisa

Objetivos: O presente estudo visa aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas (exame de sangue) para o diagnóstico e controle de cura após tratamento com Praziquantel (remédio em uso no Brasil).

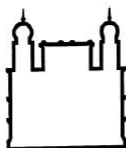
Descrição do Estudo: Serão colhidas amostras das fezes, urina e também serão colhidas pequenas quantidades de sangue (10 ml) antes e após o tratamento. Os exames de fezes irão detectar os ovos dos vermes com mais precisão, podendo facilitar assim, futuramente, o controle da transmissão das doenças. Os exames de sangue e de urina têm como propósito detectar anticorpos e antígenos (substâncias específicas no sangue) e DNA (traços do parasito na urina) que ajudam a reforçar o diagnóstico da doença e confirmam a cura após o tratamento.

Benefícios: Os participantes que apresentarem infecção detectada pelo exame de fezes serão tratados gratuitamente com praziquantel ou oxamniquine, no caso de xistose e com albendazol ou mebendazol em caso de outras verminoses. Serão também dadas noções de higiene com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: (+55) (31) 3349 7740 - Fax: (+55) (31) 3295-3115

E-mail: coellhopm@cpqrr.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Esquistossomose

Riscos em potencial: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses.

Permissão para revisão dos dados (confidencialidade): As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP - CPqRR, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Entendimento por parte dos participantes: Eu pude fazer todas as perguntas relacionadas ao presente projeto e autorizo a equipe de pesquisadores acima relacionados a me incluir ou aquele(s) que estão sob a minha responsabilidade, na presente pesquisa. Estou ciente que a qualquer momento poderei interromper minha participação no projeto sendo garantida à assistência médica necessária. Posso, a qualquer momento, discutir questões relacionadas aos meus direitos, relativas a qualquer aspecto do presente projeto durante ou após sua execução.

Consentimento: Com base no exposto, estou ciente dos procedimentos que serão realizados durante este estudo e concordo em participar voluntariamente do mesmo, (autorizo também a participação do menor mencionado). Tenho conhecimento da importância da minha cooperação e do meu compromisso com o sucesso da pesquisa. Sendo assim, autorizo os pesquisadores a marcarem os exames e tratamentos relacionados à pesquisa e me contactarem, conforme o andamento do projeto.

Se houver um compromisso ao qual não possa comparecer avisarei com antecedência.

Nome do participante

Ass. do participante

Nome do Pesquisador

Ass. do Pesquisador

→ **Para maiores esclarecimentos, em caso de necessidade e/ou eventos adversos relacionados à sua participação na pesquisa, entre em contato com o CEP - CPqRR (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825 – Email: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br**

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: (+55) (31) 3349 7740 - Fax: (+55) (31) 3295-3115

E-mail: coelhohp@cpqrr.fiocruz.br