

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Leandro Batista Wanderley

Avaliação da técnica Nested-PCR no diagnóstico de *Schistosoma mansoni* em caramujos e amostras biológicas humanas

RECIFE

2017

LEANDRO BATISTA WANDERLEY

Avaliação da técnica Nested-PCR no diagnóstico de *Schistosoma mansoni* em caramujos e amostras biológicas humanas

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientador:

Dra. Maria Cynthia Braga

Coorientadores:

Dr. Fábio Lopes de Melo

Dra. Maria Almerice Lopes da Silva

Recife

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- W245a Wanderley, Leandro Batista.
Avaliação da técnica nested-PCR no diagnóstico de *Schistosoma mansoni* em caramujos e amostras biológicas humanas / Leandro Batista Wanderley. - Recife: [s.n.], 2017.
92 p. : ilus., graf., tab.; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadora: Maria Cynthia Braga; coorientadores: Fábio Lopes de Melo, Maria Almerice Lopes da Silva.
1. Esquistossomose mansoni - diagnóstico. 2. Reação em Cadeia de Polimerase. 3. Sensibilidade e Especificidade. 4. DNA de helmintos - genética. 5. Estudos de avaliação. 6. Estudos comparativos. I. Braga, Maria Cynthia. II. Melo, Fábio Lopes de. III. Silva, Maria Almerice Lopes da. IV. Título.

LEANDRO BATISTA WANDERLEY

Avaliação da técnica Nested-PCR no diagnóstico de *Schistosoma mansoni* em caramujos e amostras biológicas humanas

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Aprovada em 31/10/2016

BANCA EXAMINADORA

Dra Maria Cynthia Braga (Orientadora)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Zulma Maria de Medeiros

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Elaine Christine de Souza Gomes

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dedico este trabalho aos meus pais Marcus e Irene, e meus irmãos Danillo e Marcus Túlio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, à Deus, por estar sempre respondendo as minhas preces conforme a vontade divina, e não de acordo com o que eu queria; por estar sempre guiando meus passos e me mostrando o melhor caminho.

Em segundo lugar, agradeço à minha família. Meus pais Marcus e Irene que, com todo carinho e amor que os pais podem oferecer aos seus filhos, me apoiaram nas diversas decisões que tomei durante a minha vida, e por todos os conselhos dados. Obrigado por todo o investimento em minha educação e por terem demonstrado a importância da educação na vida de uma pessoa. Afirmo que esses ensinamentos foram muito importantes e ajudaram a moldar o meu caráter e a mostrar que com esforço, dedicação e humildade podemos alcançar os nossos sonhos. Aos meus irmãos, agradeço pelo apoio, momentos de distrações, diversões e até brigas, coisas que só fortaleceram os nossos laços.

À Dra. Cynthia Braga, agradeço por ter aceitado me orientar. Sei o quanto foi desafiante orientar um trabalho que não se enquadrava no seu estilo de trabalho habitual. Mas tenha a certeza que a qualidade que o trabalho alcançou, só foi possível devido aos seus ensinamentos e puxões de orelha. Agradeço por me mostrar que quando um método é bem construído, o restante do trabalho se torna menos exaustivo.

Ao meu co-orientador Fábio Melo, só posso dizer o quão gratificante foi ter sido seu orientando desde a graduação. Obrigado por todo o ensinamento na parte molecular do trabalho, por todos os conselhos dados, por me puxar para a realidade e me fazer amadurecer ainda mais durante o doutorado. Fico feliz em saber que mesmo após o término deste trabalho, a amizade irá perdurar.

À minha co-orientadora Almerice, minha amiga acima de tudo, quero deixar escrito o meu sincero MUITO OBRIGADO. Pelos puxões de orelha, conselhos, almoços e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho. Fico feliz em contar com sua amizade dentro e fora do trabalho. Acho que boa parte da visão que passei a ter durante o doutorado, se deve ao que aprendi com você.

Aos meus colegas do LDT, Rhaissa, Elis, Walter, Cynthia, Mari, Patrícia, Sarah, agradeço pelas risadas, desabafos e ajuda durante este período.

Aos meus amigos Eduardo, Priscila, Paula O. e Paula F., os quais conquistei quando entrei no Aggeu, preciso agradecer pelos puxões de orelhas (que foram muitos) e pelo apoio durante todo o processo.

Às minhas irmãs de coração Adriane, Bruna e Michelle, obrigado por existirem. Obrigado pelas palavras reconfortantes em todos os momentos, pelos momentos que compartilhamos e que compartilharemos por muito tempo. O apoio de vocês me fez nunca desistir dos meus objetivos e me leva a querer me desafiar cada vez mais.

A todos os colegas do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde, meu obrigado pelo companheirismo durante as aulas, aperreios durante as provas e seminários e diversões durante o caminho.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, meu muito obrigado pelo acolhimento durante os 10 anos vivenciados neste centro. Obrigado por ter me acolhido e me mostrado como é bom fazer ciência.

Às Secretarias de Saúde dos municípios de Cabo de Santo Agostinho e Jaboatão dos Guararapes por terem apoiado e contribuído com o nosso projeto, sempre visando o melhor para o paciente e para a comunidade. Em especial às coordenadoras da Esquistossomose Bruna Botelho e Éllyda Gomes.

Aos colegas Igor Bruscky e Carolina Cunha, pela parceria nas amostras de pacientes com neuroesquistossomose.

Aos órgãos de fomento, principalmente CAPES e FACEPE, pela bolsa e suporte financeiro da pesquisa.

A todos que me ajudaram de alguma forma durante o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

WANDERLEY, Leandro Batista. *Avaliação da técnica Nested-PCR no diagnóstico de Schistosoma mansoni em caramujos e amostras biológicas humanas*. 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

As técnicas diagnósticas para a esquistossomose apresentam baixa acurácia, tornando-se necessárias novas técnicas para seu diagnóstico. O objetivo do estudo foi avaliar o desempenho de dois sistemas Nested PCR (NPCR) para o diagnóstico de *S. mansoni* em caramujos e amostras humanas. Foram otimizados quatro ensaios de PCRs simples testando diferentes concentrações de *primers* e magnésio. Em seguida, esses sistemas foram combinados em duas NPCRs. A sensibilidade dos sistemas foi avaliada nas concentrações entre 1ng e 0,1fg de DNA genômico de *S. mansoni* e a especificidade com DNA de cercária ave. Nas amostras humanas, a NPCR1 foi avaliada apenas em DNA extraído de amostras de LCR (n=50) de pacientes com ou sem neuroesquistossomose. A NPCR2 foi avaliada em amostras de sangue e urina de indivíduos infectados (n=99) e não infectados (n=21). Para os caramujos, o sistema NPCR2 foi avaliado por mimetismo da infecção em lotes de *B. glabrata* (n=50), adicionando diferentes concentrações de DNA (1ng, 10pg e 10fg) antes da extração, e através de lotes contendo diferentes quantidades de caramujos infectados em laboratório. A NPCR2 foi cem vezes mais sensível que a NPCR1 amplificando 0,1fg de DNA. Os dois sistemas amplificaram o DNA da cercaria de ave, mas apenas a NPCR2 conseguiu distinção entre as bandas. A NPCR1 apresentou 80% de sensibilidade, 100% de especificidade e valor preditivo positivo, 88% de valor preditivo negativo e 92% de acurácia no LCR. Já a NPCR2 apresentou uma melhor sensibilidade para as amostras de urina, apresentando baixa acurácia no sangue. Para o mimetismo em caramujos, o sistema de NPCR2 amplificou 1ng de DNA, e o lote contendo 1 caramujo com 5 dias de infecção. Conclui-se que a técnica permite o diagnóstico da doença em caramujos e amostras humanas, principalmente em pacientes com neuroesquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Diagnóstico. Reação em Cadeia de Polimerase.

WANDERLEY, Leandro Batista. **Nested-PCR evaluation for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in snails and human biological samples**. 2017. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

Diagnostic techniques for schistosomiasis present low accuracy and new techniques for diagnosis are necessary. The objective of this study was to evaluate the performance of two Nested PCR (NPCR) for the diagnosis of *S. mansoni* in snails and human samples. Four PCRs protocols were optimized by testing different concentrations of primers and magnesium. These systems were then combined into two NPCRs. The sensitivity of the systems was evaluated at concentrations between 1ng and 0.1fg of *S. mansoni* genomic DNA and specificity with avian cercariae DNA. In human samples, NPCR1 was evaluated only in DNA extracted from CSF samples (n = 50) from patients with or without neuroschistosomiasis. NPCR2 was evaluated in blood and urine samples from infected (n = 99) and non-infected (n = 21) individuals. For snails, the NPCR2 system was evaluated by mimicking the *B. glabrata* (n = 50) batch infection, adding different concentrations of DNA (1ng, 10pg and 10fg) prior to extraction, and by lots containing different amounts of snails infected in the laboratory. NPCR2 was one hundred times more sensitive than NPCR1 by amplifying 0.1fg of DNA. The two systems amplified the DNA of the avian cercaria, but only the NPCR2 managed to distinguish between the bands. NPCR1 showed 80% sensitivity, 100% specificity and positive predictive value, 88% negative predictive value and 92% accuracy in CSF samples. On the other hand, the NPCR2 presented a better sensitivity for the urine samples, presenting low accuracy in the blood. For mimicry in snails, the NPCR2 system amplified 1ng of DNA, and the batch containing 1 snail with 5 days of infection. It is concluded that the technique allows the diagnosis of the disease in snails and human samples, mainly in patients with neuroschistosomiasis.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, Diagnostic, Polymerase Chain Reaction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição geográfica da Esquistossomose no mundo.....	10
Figura 2 – Distribuição geográfica da Esquistossomose mansônica no Brasil.	11
Figura 3 – Distribuição espacial de <i>Biomphalaria spp.</i> no Brasil.....	12
Figura 4 - Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	14
Figura 5 - Fluxograma da realização das Nested-PCR nas amostras humanas.....	40
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos das PCRs simples utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	48
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos das Nested PCRs utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	49
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a especificidade das Nested PCRs frente ao DNA de cercaria de ave.	50
Figura 9 – Padrão de bandas gerados para os produtos de sequenciamento utilizando a enzima HaeIII no programa ApE plasmid.	51
Figura 10 – Padrão de bandas gerados para os produtos de sequenciamento utilizando a enzima Hhai no programa ApE plasmid.....	51
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o padrão de bandas obtidos após a RFLP.....	52
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da NPCR2 aplicada aos lotes de caramujos com 5 dias de infecção.....	56
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da NPCR2 aplicada aos lotes de caramujos com 21 dias de infecção.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais aplicações das técnicas moleculares para <i>Schistosoma mansoni</i>	18
Quadro 2 - Técnicas moleculares desenvolvidas e aplicadas para o diagnóstico de <i>S. mansoni</i> em caramujos.....	25
Quadro 3 – Primers e ciclagem dos sistemas de PCRs simples	37
Quadro 4 - Formação das Nested-PCR de acordo com os primers	37
Quadro 5 – Distribuição dos lotes e quantidades de caramujos positivos e negativos presentes em cada lote dos grupos 1 e 2.....	43
Quadro 6 – Condições de cloreto de magnésio e primers das PCRs simples após otimização	48
Quadro 7 – Condições de cloreto de magnésio e primers das Nested PCRs após otimização.	49
Quadro 8 – Características epidemiológicas e resultados da NPCR1 e ELISA em pacientes confirmados para neuroesquistossomose.....	53
Quadro 9 – Resultados da NPCR2 em pools de caramujos com 5 e 21 dias após a infecção experimental	57

SUMÁRIO

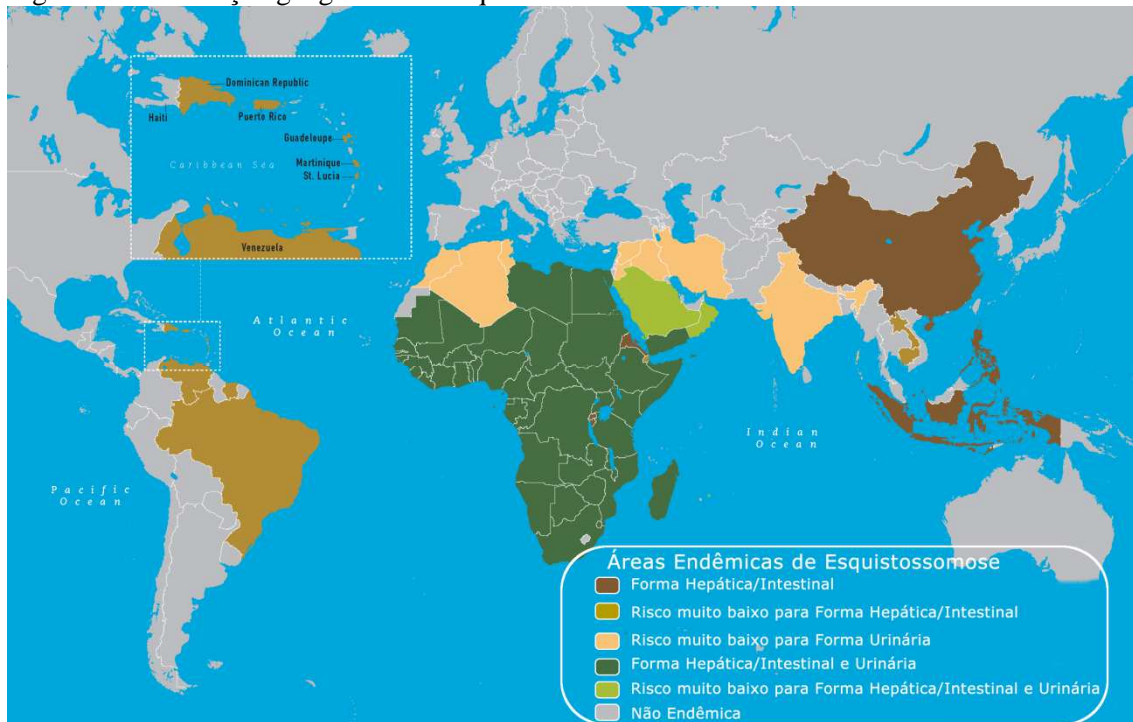
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Diagnóstico Molecular – Polymerase Chain Reaction (PCR)	21
2.1.1 Diagnóstico Molecular de <i>S. mansoni</i> em Caramujos.....	23
2.1.2 Diagnóstico molecular de <i>S. mansoni</i> em amostras biológicas humanas.....	27
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Otimização das PCRs	36
4.1.1 Extração e purificação do DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	36
4.1.2 PCRs Simples	36
4.1.3 Nested PCR convencional (NPCR)	37
4.1.4 Análise da sensibilidade e especificidade dos sistemas de PCR	38
4.1.4.1 <u>Reação de Sequenciamento</u>	38
4.1.4.2 <u>Análise de fragmentos polimórficos por enzimas de restrição</u>	39
4.1.5 Análise e registro dos resultados da avaliação da sensibilidade e especificidade dos sistemas.....	39
4.2 Avaliação dos sistemas de NPCR	40
4.2.1 Avaliação nas amostras humanas	40
4.2.1.1 <u>Seleção das amostras</u>	40
4.2.1.1.1 <i>LCR</i>	40
4.2.1.1.2 <i>Sangue e urina</i>	41
4.2.1.1.3 <i>Fezes</i>	42
4.2.2 Avaliação nas amostras de caramujo.....	43
4.2.2.1 <u>Extração e purificação do DNA dos caramujos</u>	44
4.2.2.2 <u>Processamento e análise das amostras de caramujos</u>	44
4.2.3 Análise dos dados	45
4.2.3.1 <u>Amostras humanas</u>	45
4.2.3.2 <u>Amostras de caramujos</u>	46
4.3 Considerações éticas	46
4.4 Limitações do estudo	46

4.4.1 Amostras humanas.....	46
4.4.2 Amostras de caramujos.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Otimização dos sistemas de PCR simples.....	48
5.2 Otimização dos sistemas de Nested PCR.....	48
5.3. Avaliação da Especificidade dos sistemas de Nested PCR.....	49
5.3.1 Sequenciamento e RFLP	50
5.4 Avaliação dos sistemas de NPCR em amostras	52
5.4.1 Avaliação do sistema NPCR1 em amostras de LCR de casos suspeitos.....	52
5.4.2 Avaliação do sistema NPCR2 nas amostras humanas de sangue e urina.....	53
5.5 Avaliação dos testes em caramujos	55
5.5.1 Mimetização da extração de DNA em caramujos	55
5.5.2 Avaliação da NPCR2 em caramujos infectados	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	64
APENDICE A – QUESTIONÁRIO ESQUISTOSSOMOSE - CASOS	79
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ESQUISTOSSOMOSE – NÃO CASOS	81
APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 18 ANOS).....	83
APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS).....	85
APÊNDICE E - ARTIGO PUBLICADO	87
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	91

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. guineensis*), de ocorrência endêmica em diversos países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (COLLEY et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1- Distribuição geográfica da Esquistossomose no mundo.

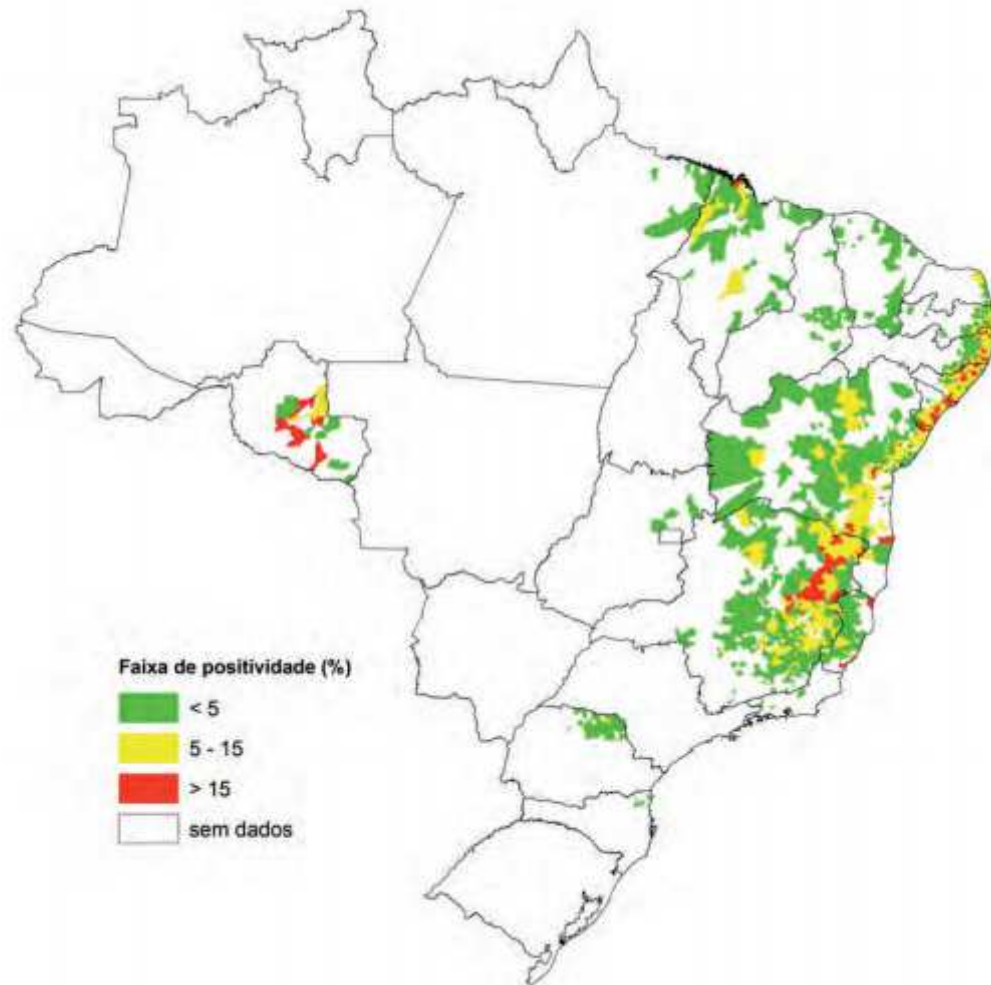


Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2013, tradução nossa).

A esquistossomose mansônica, também conhecida como Bilharziose, Xistose, Xistosa, Doença dos Caramujos, Barriga d'Água, Doença de Manson-Pirajá da Silva (BRASIL, 2014), é a forma mais amplamente distribuída no mundo, estando presente em países dos continentes Africano e Asiático e nas regiões do Oriente Médio, Caribe e América do Sul (GRYSEELS, 2012). Estima-se que, para estas duas últimas regiões, cerca de 25 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença e que seis milhões estão infectadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

No Brasil, país que concentra a maior parte dos casos notificados das Américas, o *S. mansoni* é o único agente etiológico da doença havendo registros de casos autóctones em mais de 15 estados da federação (Figura 2), a maioria registrada nas Regiões Nordeste e Sudeste do país (BRASIL, 2014).

Figura 2 – Distribuição geográfica da Esquistossomose mansônica no Brasil.



Fonte: Brasil (2014).

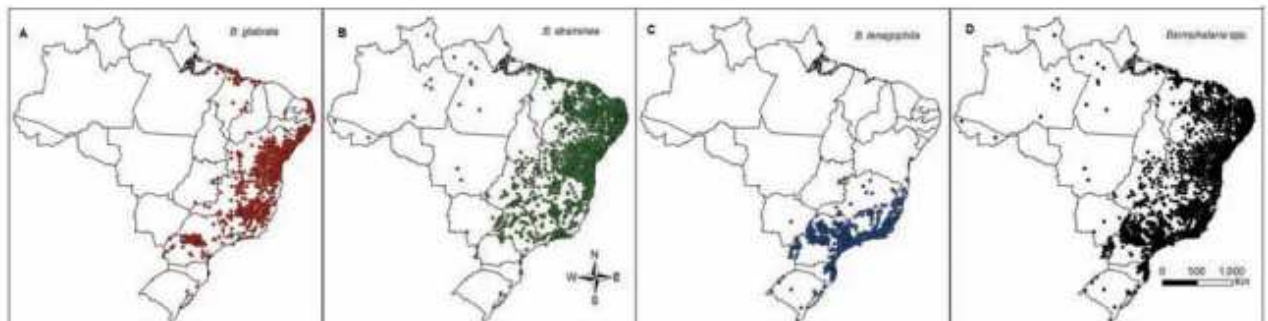
No estado de Pernambuco, onde se observa o segundo maior nível de endemidade no país (BRASIL, 2016), os hospedeiros intermediários da esquistossomose são as espécies *B. glabrata* e *B. straminea* (PERNAMBUCO, 2013). No estado, casos foram registrados em 102 dos 186 municípios existentes, a maioria localizada nas regiões da Zona da Mata e Litoral (BRASIL, 2011). Recentemente, novas áreas de transmissão foram encontradas em regiões próximas ao litoral e na Região Metropolitana do Recife, sugerindo que a doença se encontra em expansão (BARBOSA et al., 2014, 2015a, 2015b).

S. mansoni é um helminto pertencente ao Filo Platyhelminthes, classe Trematoda, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. É um verme delgado, digenético, de coloração branca e sexos separados, com a fêmea adulta mais alongada e albergada pelo macho (BRASIL, 2014). O seu ciclo biológico se completa em torno de 80 dias e envolve dois hospedeiros: um definitivo ou vertebrado, como roedores, marsupiais, carnívoros

silvestres, ruminantes e principalmente humanos; e um intermediário ou invertebrado, em geral caramujos do gênero *Biomphalaria* (BRASIL, 2014; REY, 2011).

Os hospedeiros intermediários no Brasil são caramujos gastrópodes aquáticos pertencentes à família Planorbidae, havendo registro da existência de 11 espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* spp. Dessas, apenas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*, e estão presentes, principalmente, nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do Brasil (BRASIL, 2014). Embora *B. straminea* seja a espécie mais bem adaptada e amplamente distribuída (encontrada em 24 estados brasileiros e no Distrito Federal), *B. glabrata* é considerada a espécie de maior importância clínico-epidemiológica devido a ampla distribuição em 16 estados brasileiros, além do Distrito Federal e por estar fortemente associada à distribuição dos casos de esquistossomose no território brasileiro. A espécie *B. tenagophila* foi notificada em apenas 10 estados e no Distrito Federal, sendo mais prevalente na região Sul (FIGURA 3) (BRASIL, 2014; SCHOLTE et al., 2012).

Figura 3 – Distribuição espacial de *Biomphalaria* spp. no Brasil.



Fonte: Carvalho et al. (2008)

A transmissão do *S. mansoni* geralmente ocorre mediante contato do homem com coleções hídricas (córregos, lagoas, lagos e canais de drenagem e de irrigação) contendo caramujos infectados, os quais liberam as cercárias, a forma infectante para o humano (GRYSEELS, 2012). As cercárias possuem uma cauda bifurcada, um corpo cercariano e uma cabeça com duas ventosas que facilitarão no momento de fixação na pele do hospedeiro (COLLEY et al., 2014). Cerca de quatro semanas após o desenvolvimento das cercárias dentro do molusco, elas são liberadas e atingem o meio aquático, principalmente entre as 11 e 15 horas do dia (devido à luminosidade e temperatura adequadas), e permanecem nadando na água por até 72 horas. Ao entrarem em contato com o hospedeiro vertebrado, essas formas

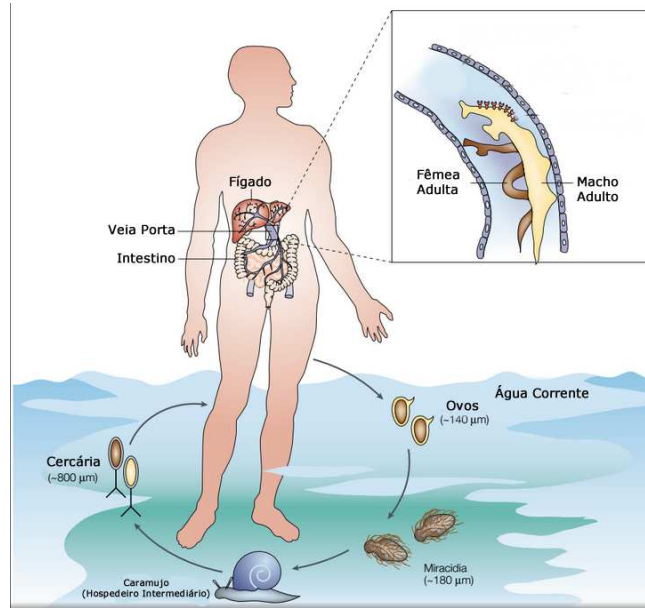
penetram ativamente através da pele, abandonam a sua cauda e se transformam em esquistossômulos (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS, 2012).

Após atingirem a corrente sanguínea e/ou linfática, os esquistossômulos chegam ao coração e pulmões, podendo posteriormente atingir diversos órgãos, preferencialmente o fígado, onde os vermes se desenvolvem por aproximadamente 45 dias, e atingem a forma adulta, podendo permanecer por até 30 anos no hospedeiro (GRYSEELS, 2012). Ao alcançarem as veias mesentéricas do fígado, ocorre o acasalamento entre fêmeas e machos culminando com uma postura de aproximadamente 300 ovos por dia pela fêmea grávida (COLLEY et al., 2014).

Os ovos de *S. mansoni* possuem morfologia bem característica, com um polo anterior mais delgado e o posterior mais volumoso, com um espículo lateral saliente e agudo em suas proximidades, que o diferencia das demais espécies de helmintos intestinais (BRASIL, 2014). Quando estes ovos atingem a luz intestinal, eles são evacuados juntamente com as fezes e, ao encontrar um meio aquático favorável, liberam os miracídios, forma aquática ciliada e infectante para o hospedeiro intermediário (COLLEY et al., 2014). Uma vez no interior do caramujo, o miracídio perde seu epitélio ciliado e dá origem ao esporocisto primário, o qual, após aumento de tamanho, irá se romper e dará origem a uma quantidade de 20 a 40 esporocistos secundários. Estes, por sua vez, migram para o hepatopâncreas e ovotéstis do molusco e dentro de um período de três a quatro semanas irão maturar e dar origem às cercarias, que serão liberadas no meio aquático. Após a produção de várias cercarias, estes esporocistos podem ainda formar esporocistos terciários capazes de gerar novas cercarias (REY, 2011) (Figura 4).

Pinto (2013) relata que moluscos do gênero *Biomphalaria* podem ser encontrados naturalmente infectados por cercárias de outros trematódeos, como *Cercaria macrogranulosa*, *Cercaria minense*, *Cercaria acaudata*, *Cercaria caratinguensis* e que muitas dessas cercarias são responsáveis por infectar aves, peixes, tartarugas e outros animais.

Figura 4 - Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Adaptado de Pearce e Macdonald (2002, tradução nossa)

A inexistência de métodos eficazes de controle dos moluscos, as precárias condições de moradia e de saneamento, ocasionam o íntimo contato humano com as águas infectadas, constituindo um dos importantes determinantes da persistência e expansão da doença em nosso meio (PORDEUS et al., 2008).

A fase aguda da esquistossomose mansônica corresponde ao período de penetração das cercárias no organismo, de maturação do verme e postura dos ovos, podendo ou não ser sintomática. A forma aguda sintomática pode se manifestar por sintomas clínicos inespecíficos, como febrícula, reação inflamatória de hipersensibilidade imediata, prurido e dilatação de arteríolas e capilares que pode aparecer semanas ou meses após a infecção (COLLEY et al., 2014). Em alguns casos os ovos podem atingir o fígado, levando à formação de granulomas e ocasionando febre, sudorese, calafrios, emagrecimento, diarreia, dentre outros sintomas, que podem levar à morte (GRYSEELS et al., 2012).

Em decorrência de uma hipersensibilidade retardada, há o desenvolvimento de pápulas, formando a dermatite cercariana (PRATA; COURA, 2008). A gravidade da forma aguda dependerá da intensidade da infecção e da resistência do indivíduo (COLLEY et al., 2014). Nessa fase, por se caracterizar pela intensa reprodução dos vermes adultos, o diagnóstico clínico pode ser confirmado através da observação dos ovos eliminados nas fezes dos indivíduos doentes ou por meio de testes imunológicos de detecção de anticorpos ou antígenos do parasito (REY, 2011).

A forma crônica é classificada de acordo com a gravidade do quadro em forma leve (assintomática, hepatointestinal e hepática) e grave ou avançada (hepatoesplênica) (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

A forma leve se caracteriza pela presença de sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, diarreia, sensação de plenitude gástrica e dor abdominal. (SOUZA et al., 2011). Ao exame clínico, o fígado está aumentado e o baço não é palpável (NEVES et al., 2011). Nessa fase, o diagnóstico é confirmado com base nos resultados dos exames coprológicos juntamente com dados clínicos e epidemiológicos (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

As consequências mais graves da infecção pelo *S. mansoni* são as secundárias ao aumento da pressão sanguínea portal, devido à fibrose hepática periportal que progride com a evolução da doença e pode levar à obstrução do fluxo sanguíneo nas veias intra-hepática portal e esplênica (MANZELLA et al., 2008). Diferentes níveis de fibrose periportal podem ser detectados pelo exame ultrassonográfico (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010; DOMINGUES, 2008).

Dentre as formas ectópicas que podem ser desenvolvidas, temos a Esquistossomose Pulmonar, a Forma Pseudoneoplásica ou Tumoral, a Nefropatia Esquistossomótica, Forma Panvisceral (PRATA; COURA, 2008) e a neuroesquistossomose, tida como a forma ectópica mais grave da infecção pelo *S. mansoni* (FERRARI; MOREIRA; CUNHA, 2008). Normalmente, seu diagnóstico é realizado pelo achado de esquistossomose e do distúrbio neurológico mielomeningorrádicular caracterizado por Paraparesia, Paraparestesia e hipoestesia principalmente em região selar (S1 a S5), alterações esfinterianas vesical e retal, tanto com incontinência como retenções e Impotência sexual (MATAS, 2001). Sua real epidemiologia é desconhecida devido ao fato da dificuldade de se diagnosticar clínica ou laboratorialmente esta forma clínica (CARVALHO, 2013).

Tradicionalmente, a esquistossomose mansônica é diagnosticada por métodos parasitológicos ou imunológicos. Os testes parasitológicos consistem na identificação direta do parasito em suas diferentes formas evolutivas, quando presentes no hospedeiro invertebrado (caramujos) ou vertebrado (humano) e são os mais utilizados para diagnosticar a presença do parasito devido principalmente o seu baixo custo e simplicidade na realização da técnica (BRASIL, 2014).

Nos humanos, diversos testes imunológicos para detecção de anticorpos específicos ou antígenos circulantes de *Schistosoma* foram desenvolvidos e têm sido empregados no diagnóstico da doença, sobretudo em sua fase crônica. Os principais testes imunológicos atualmente disponíveis são a intradermoreação, as reações de fixação do complemento,

imunofluorescência indireta, técnica imunoenzimática (Enzyme linked immunosorbent assay – ELISA) e ELISA de captura (GOMES; ENK; RABELLO, 2014; VITORINO et al., 2012). Estes testes são particularmente úteis quando não é possível observar ovos do parasito nas fezes, principalmente em pacientes com carga parasitária baixa (ZHAO et al., 2012). Contudo, além do custo elevado, muitos deles apresentam a desvantagem de fornecerem resultados positivos por algum tempo após a cura e, portanto, apresentando baixa confiabilidade na avaliação da resposta terapêutica e da persistência da infecção (CAVALCANTI et al., 2013; GRYSEELS et al., 2006; ZHAO et al., 2012;).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a pesquisa coprológica de ovos por meio de técnicas quantitativas e de sedimentação para a realização do diagnóstico, sendo a técnica de Kato-Katz considerada padrão ouro para as formas agudas da doença e a Ultrassonografia para as formas crônicas (MONTRESOR, 1998). A técnica de Kato-Katz é simples, rápida e barata e consiste na pesquisa dos ovos do parasita nas fezes de indivíduos infectados através do preparo de lâminas e posterior visualização em microscópio ótico (KATZ; CHAVES; PELEGRINO, 1972), sendo uma das técnicas mais utilizadas no diagnóstico da esquistossomose (GRAY et al., 2011). A OMS recomenda a realização e leitura de duas lâminas por amostra de paciente, pois os ovos são de fácil identificação devido ao seu tamanho e formato característicos, permitindo a diferenciação de ovos de outras espécies de helmintos (GRYSEELS, 2012).

A técnica Kato-Katz é 100% específica e possibilita a quantificação de ovos de *S. mansoni* quando a intensidade da infecção é alta ou moderada (GRAY et al., 2011; ZHAO et al., 2012). Esse método permite avaliar a intensidade da infecção e é o método de escolha em inquéritos epidemiológicos e na avaliação da resposta ao tratamento antiparasitário no Brasil. Em áreas com baixa carga parasitária, o Ministério da Saúde do Brasil (MS) recomenda a realização deste teste em três amostras consecutivas, com duas lâminas cada uma (BRASIL, 2014).

Entre as limitações das técnicas parasitológicas, as principais são a incapacidade de detecção da infecção no período pré-patente, a baixa sensibilidade em pacientes com baixa carga parasitária, além da baixa acurácia do teste em inquéritos conduzidos em áreas com baixa endemicidade ou após o tratamento em massa (GRAY et al., 2011; ZHAO et al., 2012). Outra limitação do método se deve à dificuldade de detecção da parasitose em uma única amostra devido às variações diárias e distribuição aleatória de ovos liberados nas fezes (BERHE et al., 2004; ENGELS; SINZINKAYO; GRYSEELS, 1996), sendo recomendada a

coleta de amostras seriadas ou a realização em mais de uma lâmina por amostra de paciente (LAMBERTON et al., 2014; MEURS et al., 2015).

Outros métodos de detecção do parasito em humanos utilizados em menor escala são a técnica de sedimentação espontânea (Lutz), a técnica de eclosão dos miracídios (BRASIL, 2014), a raspagem retal, biópsia retal e biópsia hepática em pacientes suspeitos e que não apresentam ovos nas fezes (BRASIL, 2014; GRAY, et al., 2011; ZHAO et al., 2012).

Para o caramujo, as técnicas consideradas padrão ouro que são utilizadas para confirmação da infecção consistem na identificação da cercária liberada pelo caramujo após a exposição à luz, ou através do esmagamento dos moluscos entre placas de vidro para observação de esporocistos em um microscópio óptico. Ambos são testes simples e de baixo custo. (CALDEIRA; JANOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009).

Apesar da simplicidade na execução dos métodos diagnósticos e da eficácia dos esquemas terapêuticos, a vigilância epidemiológica e o controle da esquistossomose ainda permanecem um desafio, em parte devido às limitações diagnósticas das técnicas diagnósticas disponíveis, aos setores da saúde.

Dentre as limitações das técnicas parasitológicas de detecção do parasita em moluscos, destacam-se a dificuldade de diferenciação da cercária de *S. mansoni* de outros trematódeos, a baixa sensibilidade em situações de baixa carga parasitária ou durante infecções pré-patentes (a liberação das cercárias ocorre em pelo menos 30 dias após a infecção), e ainda devido a problemas relativos ao desenvolvimento dos esporocistos ou à morte dos moluscos após a coleta e exposição à luz (CALDEIRA; JANOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009). Outra dificuldade consiste na realização dessas técnicas que envolvem procedimentos laboriosos que exigem a realização por técnicos habilitados e, estrutura laboratorial adequada (ABATH et al., 2006). Barbosa et al. (1992) relatam que a observação da liberação de cercárias em *B. straminea* nem sempre é possível, mesmo quando coletado em área de alta prevalência de infecção humana, resultando na subestimação da verdadeira prevalência da infecção.

Nas últimas décadas, diversas técnicas moleculares se tornaram mais acessíveis e vem sendo aplicadas para o diagnóstico de diferentes doenças infecciosas e parasitárias (GOMES; ENK; RABELLO, 2013; VERWEIJ; STENSVOLDB, 2014). Dentre elas, destaca-se o diagnóstico de *S. mansoni* em seus hospedeiros. Os principais métodos alvos desenvolvidos e testados no diagnóstico molecular de *S. mansoni* em diferentes amostras humanas e em caramujos são descritos no quadro 1 e serão mais detalhados na Seção de Revisão de Literatura.

Quadro 1 – Principais aplicações das técnicas moleculares para *Schistosoma mansoni*

Biomarcador	Método	Amostra	Sensibilidade %	Especificidade %	Referência
SM1-7 (M61098)	PCR	Fezes humanas, urina, soro e soro de rato	96–100	88–91.2	Lodh et al., 2014; Carvalho et al., 2012; Pontes; Dias-Neto; Rabello, 2002; Allam et al., 2009; Pontes et al., 2003; Enk et al., 2012; Carneiro et al., 2013
SM1-7 (M61098)	PCR	Água e plâncton	-	-	Hertel et al., 2004; Hamburger et al., 1998a
SM1-7 (M61098)	LAMP	Caramujo	-	-	Abassi et al., 2010
SM1-7 (M61098)	PCR-ELISA	Fezes humanas	-	-	Siqueira et al., 2015; Gomes et al., 2010
SM1-7 (M61098)	PCR em Tempo Real	Soro e fezes humanas	97,4%	85,1%	Espírito Santo et al., 2014;
DNA genômico	Híbridização	Caramujo	80	92,4	Hamburger; Weil; Pollack, 1987
DNA ribossomal 18S	Nested-PCR	Caramujo	-	-	Chen J-h et al., 2006
Gene mitocondrial	Multiplex PCR	Caramujo	-	-	Janotti-Passos et al., 1997; 2006
DNA satélite	LAMP	Soro e fezes de rato	-	-	Fernandez-Soto et al., 2014

Fonte: Adaptado de He et al. (2016, tradução nossa)

Nota: “-“: sem menção ou dados não acurados.

Em 2002, o grupo de pesquisadores liderados pelo Dr Frederico Abath, no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, desenvolveu e otimizou diferentes sistemas de PCR (convencional, Nested PCR e Nested PCR em único tubo) para a identificação de DNA de *S. mansoni* (ABATH et al., 2002). O desafio principal do grupo foi adaptar a técnica Nested PCR convencional (NPCR) à Nested PCR em único tubo (STNPCR) através do isolamento dos *primers* internos na face interna do microtubo tornando, portanto, desnecessária a abertura do tubo para transferência de produtos de PCR e, conseqüentemente diminuindo o uso de reagentes e o risco de contaminação. Assim, os *primers* Schfo 11, Schfo 17 e Schre 19 foram desenhados para reconhecer a região da subunidade menor do RNA ribossomal, enquanto que o primer Unvre 16 constitui um primer universal desenhado para regiões altamente conservadas das espécies. A sensibilidade dessas técnicas foi de 1pg, 0,1fg e 1fg para a PCR convencional, NPCR e STNPCR, respectivamente (ABATH et al., 2002).

Em 2006, pesquisadores do mesmo grupo (MELO et al., 2006) utilizaram os sistemas de Nested convencional e em único tubo para detecção do DNA de *S. mansoni* em caramujos coletados em sítios de transmissão da doença para humanos. Inicialmente, ao otimizar estes sistemas utilizando DNA genômico de *S. mansoni*, as sensibilidades obtidas foram de 10pg, 1fg e 10 fg para a PCR convencional, NPCR e STNPCR, respectivamente, resultados estes inferiores aos obtidos por Abath et al. (2002). Em seguida, a especificidade dos *primers* foi testada frente ao DNA de diferentes trematódeos não-schistosoma (*Echinostoma paraensei*, *Cercaria minensis*, *C. macrogranulosa* e *C. caratinguensis*), de espécies de *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum*) e de *B. glabrata* e verificaram que o sistema de PCR convencional formado pelos *primers* Schfo 17 e Schre 19 amplificou o DNA de *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. bovis*. Porém, quando estes *primers* foram utilizados na segunda reação da Nested PCR, eles apenas foram capazes de amplificar o DNA de *S. mansoni* e *S. haematobium*. Todos os sistemas desenvolvidos pelos autores foram capazes de amplificar o DNA de *S. mansoni* em caramujos infectados com miracídios em laboratório ou coletados no campo.

Posteriormente, outros *primers* foram desenhados por Melo et al. (2006) - Unvfo 2 e o Unvre 6 - porém apenas a especificidade deste sistema foi testada, tendo-se verificado que o DNA de todas as espécies citadas acima (*Echinostoma paraensei*, *Cercaria minensis*, *C. macrogranulosa*, *C. caratinguensis*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum* e *B. glabrata*) foram amplificados (MELO et al., 2006).

Apesar dos resultados obtidos com os testes em caramujos criados em laboratório e coletados em campo terem sido satisfatórios, esses sistemas ainda não haviam sido testados

em amostras biológicas humanas, o que suscitou a questão desta tese, que compreendeu duas etapas: a otimização de sistemas de PCR simples e NPCR convencional para a detecção do DNA de *S. mansoni*. A segunda etapa consistiu na avaliação do desempenho das NPCR otimizadas para a detecção do DNA de *S. mansoni* em caramujos infectados experimentalmente em laboratório e em fluidos biológicos humanos.

No momento, dois artigos foram elaborados resultantes desse trabalho. O primeiro artigo descreve as etapas de otimização das PCRs e avaliação das Nested PCR em amostras de sangue e urina humanas. O segundo apresenta os resultados da avaliação da NPCR na detecção do DNA de *S. mansoni* em caramujos da espécie *B. glabrata* infectados experimentalmente em laboratórios. Adicionalmente, essa tese apresenta um artigo publicado em colaboração (BRUSCKY et al. 2016), que apresenta os resultados de um dos sistemas de NPCR otimizados na detecção de *S. mansoni* em amostras de líquido cefalorraquidiano de casos confirmados de neuroesquistossomose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diagnóstico Molecular – Polymerase Chain Reaction (PCR)

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma das técnicas de biologia molecular que permite a replicação do DNA de agente viral, bacteriano ou parasitário utilizando enzimas, sem a necessidade de utilização de um organismo vivo. A técnica permite a amplificação exponencial de uma pequena quantidade de moléculas de DNA, possibilitando que a análise seja feita mais facilmente. A técnica da PCR foi desenvolvida em 1983 por Kary Mullis e atualmente amplamente utilizada e considerada de grande importância na medicina e laboratórios de pesquisas biológicas (GRUNENWALD, 2003).

Para sua realização é necessário adicionar os seguintes reagentes em um mesmo tubo (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008): |

- a) Dois pequenos iniciadores denominados *primers*, desenhados para serem complementares às sequências desejadas do DNA alvo e dar início à formação de uma dupla fita de DNA;
- b) Desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), uma solução formada a partir da adição de quatro bases trifosfatadas Desoxiadenosina trifosfato – (dATP), Desoxicidina trifosfato (dCTP), Desoxiguanosina trifosfato (dGTP) e Desoxitimidina trifosfato (dTTP), necessários para a formação da nova fita de DNA;
- c) Uma enzima (DNA polimerase) termoestável, responsável pela extensão e formação da nova fita de DNA;
- d) Íons magnésio (Mg^{2+});
- e) Tampão.

Após acrescentar o DNA a ser estudado, estes reagentes serão incubados em um equipamento chamado termociclador, passando por ciclos de diferentes temperaturas, e amplificando o DNA do agente de interesse quando presente.

A PCR convencional é realizada em três etapas repetidas compostas em média por 25 a 35 ciclos, sob uma temperatura ótima para sua maior eficiência. As etapas desta técnica consistem nas seguintes:

- 1) Desnaturação do DNA, quando se separa a dupla fita de DNA, a 90 - 95 °C de temperatura;

2) Anelamento dos iniciadores ao DNA molde, que ocorre a uma temperatura em geral entre 50 a 70 °C, de acordo com o conjunto de iniciadores utilizados;

3) Extensão dos iniciadores, que corresponde à síntese da nova fita de DNA pela enzima DNA polimerase, usualmente a realizada a uma temperatura de 72 °C (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2006).

O produto final da reação de PCR é chamado de *amplicon*, que consiste em um fragmento de DNA fita dupla cujas extremidades são definidas pela extremidade 5' de cada um dos *primers* e cujo tamanho é dado pela distância entre os mesmos. A visualização do *amplicon* é dada através da realização de uma eletroforese em gel de agarose, contendo um corante fluorescente de DNA, como o brometo de etídio, e posterior visualização em transiluminador de luz ultravioleta (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2006).

É importante observar as condições ideais de concentração dos componentes da reação, pois não existe um protocolo padrão que possa ser usado para todas as amplificações. O número de ciclos, a concentração dos íons magnésio, da enzima e do DNA molde, assim como a temperatura de anelamento e a concentração dos *primers*, deve ser cuidadosamente ajustada para cada tipo de reação (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008).

Outro fator fundamental no preparo das reações está relacionado à fonte da qual o DNA será extraído. Durante o processo de extração do DNA, deve-se considerar a introdução ou a presença de inibidores que possam vir a interferir na ação da DNA polimerase. Entre os inibidores estão substâncias como o grupo heme da hemoglobina, assim como os que geralmente são introduzidos no processo de coleta ou extração do material biológico como o fenol e o clorofórmio (que podem inibir a ação enzimática); a proteinase-K (pode degradar a DNA polimerase); o EDTA e a heparina (quelantes dos íons magnésio) (SAMBROOK et al., 1989).

A acurácia (sensibilidade e especificidade) desse teste está diretamente relacionada ao conjunto de *primers* utilizados para a amplificação do DNA alvo, ao número de cópias do DNA a ser amplificado, ao método de extração de DNA escolhido, ao tipo de material a ser analisado e ao protocolo de PCR utilizado (BASTIEN; PROCOP; REISCHL, 2008).

A técnica Nested-PCR (NPCR) é uma variação da PCR convencional realizada em duas etapas consecutivas de amplificação, na qual os produtos da primeira PCR (amplificados utilizando um par de *primers* externos) servem como alvo para um segundo conjunto de *primers* denominados *primers* internos. Esta segunda reação aumenta a sensibilidade e especificidade da técnica, e tem sido recomendada para a detecção de alvos em amostras biológicas que apresente escassez de DNA (ERLICH; GELFAND; SNINSKY, 1991).

O desenvolvimento de testes moleculares de PCR para o diagnóstico da esquistossomose ganhou importância nos últimos anos como uma resposta à elevada sensibilidade e especificidade dessa técnica em relação aos métodos tradicionalmente utilizados para determinar a prevalência da infecção e a transmissão de *Schistosoma* spp em estudos de campo (GOMES; ENK; RABELLO, 2014).

2.1.1 Diagnóstico Molecular de *S. mansoni* em Caramujos

O primeiro relato de aplicação da técnica de PCR para o diagnóstico de *S. mansoni* em caramujos foi feito por Hamburger et al. (1987). Estes autores clonaram e caracterizaram uma sequência de DNA de *S. mansoni* repetida em Tandem, com um tamanho de 0,64kb, gerando uma sonda para aplicação em um Southern Blot, possibilitando a detecção de 1ng de DNA de *S. mansoni*. Porém esta sonda não se mostrou específica para *S. mansoni*, pois hibridizou com DNA de *S. haematobium* (HAMBURGER et al., 1987, 1991). Contudo, devido à técnica possuir um protocolo complexo, ela não passou a ser utilizada em estudos epidemiológicos ou para a identificação do parasita (DIAS NETO et al., 1993).

Jannotti-Passos et al. (1997), utilizando como alvo uma região repetida em tandem do DNA mitocondrial de *S. mansoni*, conseguiu demonstrar a eficiência de uma PCR de baixa stringência (Low Stringency PCR) em detectar uma banda de 62pb. A sensibilidade dos primers estudados foi de 1pg, o que equivale a 3 miracídeos por caramujo, detectando DNA de *S. mansoni* em caramujos no período pré-patente (a partir de 7 dias após infecção) ou após 24 h de sua morte, além de apresentar 100% de especificidade quando testada com DNA de outras espécies de cercarias. Adicionalmente, os autores testaram uma Multiplex-PCR que também foi específica para *S. mansoni* (JANOTTI-PASSOS et al., 1997).

Hanelt et al. (1997) desenvolveram uma Nested-PCR para o diagnóstico de caramujos infectados, utilizando como alvo a subunidade 18S do DNA ribossômico (rDNA) e relataram uma sensibilidade de 10 fg para o DNA de *S. mansoni* quando diluído em 100ng de DNA do caramujo, além de permitir a detecção de DNA de *S. mansoni* em caramujos 1 dia após infecção. Quando compararam o sistema de PCR convencional (utilizando os primers externos) com a NPCR, observaram uma sensibilidade de 51% e 92%, respectivamente.

Em outro trabalho, Hamburger et al. (1998a), desenvolveram uma PCR baseada em uma sequência de DNA de 121pb com regiões em tandem altamente repetitivas e tiveram como resultado uma sensibilidade de $1,2 \times 10^{-6}$ ng de DNA genômico e 100% de especificidade frente ao DNA de *S. haematobium* e outras cercarias de trematódeos testadas. Além disso,

conseguiram detectar DNA de cercárias mesmo após estas serem filtradas da água em um papel filtro, indicando que a técnica pode ser utilizada para avaliar sítios de transmissão de esquistossomose. Posteriormente, estes autores utilizaram o mesmo sistema de PCR para diagnosticar infecção pré-patente em caramujos infectados por *S. mansoni*, conseguindo ampliações ao misturarem o DNA de um caramujo infectado com o de 40 sadios, ou um caramujo infectado no meio de 99 sadios quando dobraram a quantidade de primers na reação (HAMBURGER et al., 1998b).

Janotti-Passos e Souza (2000) aplicaram a LS-PCR desenvolvida por Janotti-Passos et al., (1997) em caramujos *B. straminea* e *B. tenagophila* após 7 dias de exposição à miracídios, e concluíram que a técnica pode ser utilizada para avaliar sítios de transmissão da doença mesmo quando os caramujos estão em períodos pré-patentes.

Caldeira et al. (2004) utilizaram a mesma LS-PCR (JANOTTI-PASSOS et al., 1997) e detectaram DNA de *S. mansoni* em carapaças de caramujos do gênero *Biomphalaria* infectados em laboratório em até 8 semanas após a morte do caramujo, obtendo também uma distinção entre o DNA do parasita e de caramujos através da técnica de RFLP.

Semelhantemente, Janotti-Passos et al. (2006) desenvolveram uma Multiplex-PCR para identificar o DNA de 3 espécies de *Biomphalaria* (utilizando como alvo a região transcrita interna 2 – ITS2) e de *S. mansoni* (utilizando como alvo o DNA mitocondrial) numa mesma reação, conseguindo amplificar bandas distintas para cada uma das espécies.

Abbasi et al. (2010) aplicaram a técnica de Amplificação Isotérmica em Alça (LAMP) (NOTOMI et al., 2000) para a detecção do DNA de *S. mansoni* e *S. haematobium* no período pré-patente de caramujos infectados, alcançando um limite de detecção de 0,1 fg de DNA genômico e conseguindo detectar caramujos infectados em apenas 1 dia após a infecção. Alguns anos depois, Hamburger et al. (2013) adaptaram esta técnica para uso em laboratórios próximos de sítios de transmissão e testaram a técnica em caramujos infectados em laboratório (*B. glabrata*) ou naturalmente infectados (*B. pfeifferi*), comparando-a com a PCR convencional e em Tempo Real. A sensibilidade do LAMP foi maior do que a PCR convencional (0,1fg versus 1fg). O LAMP foi capaz de identificar caramujos infectados após cinco dias de uma infecção realizada com apenas 1-2 miracídios. O quadro 2 apresenta uma síntese das técnicas moleculares desenvolvidas e aplicadas para o diagnóstico de *S. mansoni* em caramujos.

Quadro 2 - Técnicas moleculares desenvolvidas e aplicadas para o diagnóstico de *S. mansoni* em caramujos.

(continua)

Autores	Técnicas	Região Alvo	Amostra	Sensibilidade	Especificidade
Janotti-Passos et al., 1997	Low Stringency PCR e Multiplex PCR	DNA mitocondrial	DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	1pg DNA genômico; 7 dias após a infecção do caramujo	<i>S. mansoni</i>
Hanelt et al., 1997	Nested PCR	Região 18S do DNA ribossomal	Caramujos infectados	10 fg para o DNA de <i>S. mansoni</i> ; 1 dia de período pré-patente;	<i>S. mansoni</i>
Hamburger et al., 1998a e b	PCR convencional	DNA ribossomal	DNA genômico de <i>S. mansoni</i> , Cercárias, Caramujos infectados	$1,2 \times 10^{-6}$ ng de DNA genômico; 1 caramujo em 40 sadios ou 1 em 99 sadios (ao dobrar a quantidade de primers)	<i>S. mansoni</i>
Janotti-Passos; Souza, 2000	Low Stringency PCR	DNA mitocondrial	<i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i> infectados	7 dias após infecção por miracídios	Não se aplica
Caldera et al., 2004	Low Stringency PCR	DNA mitocondrial	<i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i> infectados em laboratório	Não se aplica	Não se aplica
Melo et al., 2006	PCR convencional, NPCR e STNPCR	DNA ribossomal e regiões conservadas	Caramujos infectados experimentalmente; <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> obtidos em campo	PCR = 10pg; NPCR = 1fg; STNPCR = 10 fg; <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> coletados em campo – PCR = 37.5%, NPCR = 93.8% e STNPCR = 81.3%	Schfo 17 e Schre 19 → <i>S. haematobium</i> e <i>S. bovis</i> ; NPCR = <i>S. haematobium</i> ; Unvfo2 e Unvre6 = <i>Echinostoma paraensei</i> , <i>Cercaria minensis</i> , <i>C. macrogranulosa</i> , <i>C. caratinguensis</i> ; <i>S. haematobium</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>B. glabrata</i>

Quadro 2 - Técnicas moleculares desenvolvidas e aplicadas para o diagnóstico de *S. mansoni* em caramujos. (conclusão)

Janotti-Passos et al., 2006	Multiplex-PCR	ITS-2 para os caramujos e DNA mitocondrial para <i>S. mansoni</i>	<i>S. mansoni</i> , <i>B. glabrata</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. straminea</i>	7 dias após infecção por miracídeos	Não se aplica
Abassi et al., 2010	LAMP	DraI (<i>S. haematobium</i>) e Sm1-7 (<i>S. mansoni</i>)	<i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i>	0,1fg de DNA genômico; 1 dia após infecção por miracídeos	Não se aplica
Hamburger et al., 2013	PCR convencional, qPCR e LAMP	DraI (<i>S. haematobium</i>) e Sm1-7 (<i>S. mansoni</i>)	DNA genômico de <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i> ; <i>B. glabrata</i> (infectados em laboratório) e <i>B. pfeifferi</i> (em campo)	PCR convencional: 1fg qPCR: não citado LAMP: 0,1fg	Não se aplica

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.1.2 Diagnóstico molecular de *S. mansoni* em amostras biológicas humanas

Em um estudo pioneiro, Pontes, Dias Neto e Rabello, (2002), foram os primeiros autores a desenvolver e aplicar uma PCR convencional para o diagnóstico de *S. mansoni* em amostras de soro e fezes humanas, utilizando como alvo a sequência descrita por Hamburger et al. (1991). Estes autores utilizaram apenas dois passos (desnaturação e anelamento) na ciclagem da PCR em lugar dos três passos habituais, obtendo 1fg de sensibilidade para o DNA de *S. mansoni* e 100% de especificidade quando testada frente ao DNA de outros quatro helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Taenia solium*, e *Trichiuris trichiuria*). Em seguida, compararam a PCR com a técnica de Kato-katz em amostras de fezes preparadas em laboratório (misturando fezes positivas e negativas e preparando algumas diluições seriadas), tendo observado que a sensibilidade da PCR foi 10 vezes maior do que a técnica de Kato-katz. Quando testada em amostras de fezes e soro de pacientes com diferentes cargas parasitárias ou negativas, ambos diagnosticados pelo Kato-katz, esta técnica molecular foi capaz de amplificar o DNA somente nas amostras de pacientes positivos, sendo o primeiro trabalho a demonstrar que a PCR é uma técnica sensível e específica que pode ser utilizada como técnica diagnóstica da esquistossomose.

No ano seguinte, o mesmo grupo testou o sistema de PCR em amostras de fezes de 194 pacientes provenientes de área endêmica, para avaliar a eficácia da cura após dois meses de tratamento com Praziquantel. Os autores obtiveram uma boa concordância entre as técnicas de PCR e KK (Kappa = 0,8), sensibilidade entre 96,7%-97,4%, especificidade de 88%-100% e valores preditivos positivos e negativos de 78,4%-100% e 98,3%, respectivamente. Ao avaliarem a eficácia do tratamento nessa população de estudo, os autores constataram menor taxa de cura pela PCR quando comparada com a técnica KK (75,6% versus 87,8%) (PONTES et al., 2003).

Sandoval et al. (2006) desenharam diferentes pares de *primers* (gênero e espécie-específicos) para a amplificação de cinco espécies de *Schistosoma*, incluindo *S. mansoni*. Para *S. mansoni*, foram testados três pares de *primers*: CF1/CR2, CF2/CR2 e SmF/SmR. Os limites de detecção para os *primers* frente ao DNA genômico de *S. mansoni* foram de 0,98 pg para o CF1/CR2, e 1,9 pg, para CF2/CR2 e SmF/SmR. Quando testados em amostras de urina, as sensibilidades encontradas foram de 94,4% para o CF1/CR2, 66% para CF2/CR2 e 100% para o SmF/SmR.

Os *primers* CF1/CR2 e CF2/CR2 são gênero específicos e amplificaram produtos para todas as cinco espécies de *Schistosoma* testadas, enquanto que os *primers* SmF/SmR, além de

amplificarem DNA genômico de *S. mansoni*, amplificaram uma banda fraca e de tamanho menor para *Trichinella spiralis*. Quando testados em urina humana, apresentou uma especificidade de 98,9%, tendo-se verificado um resultado falso-positivo em um paciente infectado por *S. haematobium*. Os autores calcularam uma sensibilidade de 30 pg para as amostras de urinas humanas, considerando a presença de inibidores de PCR e a perda de DNA durante a extração. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou que *S. mansoni* pode ser diagnosticado através da PCR em DNA extraídos da urina humana. (SANDOVAL et al., 2006)

Sadek et al. (2008), utilizaram a PCR descrita por Hamburger et al. (1998) para detectar DNA em amostras de soro humano e comparando com a detecção de anticorpos pela técnica de Hemaglutinação Indireta (IHAT), analisando as técnicas em quatro grupos diferentes: pacientes com a forma intestinal ativa; pacientes com história pregressa de esquistossomose; pacientes com outras parasitoses e indivíduos saudáveis. Entre os pacientes com infecção ativa, a PCR apresentou resultados satisfatórios em relação à sensibilidade (97,2% versus 77,8%), especificidade (100% versus 85,7%), VPP (100% versus 84,8%), VPN (98,2% versus 78,9%) e acurácia (98,9% versus 81,6%). Além disso, o IHAT apresentou sensibilidade de 90% para o grupo 2 e 25% para o grupo 3.

Gomes et al. (2009) modificou o protocolo proposto por Pontes et al. (2002) para trabalhar em amostras de fezes. As modificações foram no método de extração, o qual passou a se utilizar um kit de extração, uso da uracil DNA glycosylase (UDG) para prevenir uma contaminação, e a adição de um controle interno de extração. Como resultados, os autores encontraram um limite de detecção de 3fg e uma moderada correlação (Índice kappa = 0,511) com o KK. A sensibilidade e especificidade foram calculadas de duas formas: considerando o KK como padrão ouro (sensibilidade da PCR de 92,9% e especificidade de 61,5%) ou considerando o paciente infectado quando apresentou positividade em uma das técnicas, somadas a uma especificidade de 100% para ambos os testes (sensibilidade de 95,3% e especificidade de 100%).

Wichmann et al. (2009) estudaram uma técnica de Real-time PCR em plasma de pacientes, obtendo positivities de 100% antes do tratamento e de 33,3% de após o tratamento.

Enk, Silva e Rodrigues (2010) estudaram um método fácil e barato para extrair DNA da urina humana artificialmente preparada, apresentando 100% de reprodutibilidade quando adicionaram 20 ng DNA em 5 ml de urina e uma positividade de até 1,28 pg de DNA/mL. Os *primers* utilizados foram os mesmos de Pontes et al. (2002).

Gomes et al. (2010) desenvolveram e avaliaram uma PCR-ELISA para o diagnóstico de diferentes espécies de *Schistosoma* nas fezes, com os mesmos primers de Pontes et al. (2002), apresentando um limite de detecção de 1.3 fg de DNA de *S. mansoni*, o equivalente à 0,15 ovos de *S. mansoni* por grama de fezes, uma sensibilidade de 97,4% e especificidade de 85,1%.

Oliveira et al. (2010) avaliaram a PCR como uma ferramenta adicional no diagnóstico de *S. mansoni* em amostras de fezes de indivíduos com uma baixa carga parasitária. Utilizaram os protocolos de Pontes et al., (2002) e Sandoval et al. (2006) com modificações. Quando testados em amostras de fezes sabidamente negativas adicionadas de diferentes quantidades de ovos (1, 5, 10, 15, ou 25 ovos de *S. mansoni*), os dois sistemas apresentaram resultados positivos. Os primers de Pontes et al. (2002) conseguiram detectar 25/34 (73,5%) amostras, enquanto que os primers de Sandoval et al. (2006) detectaram 28/34 (82,4%). Ambos foram 100% específicos quando testados com DNA de doadores sadios.

Haggag e Abdullah (2011) modificaram a PCR descrita por Hamburger et al. (1991) retirando a etapa de extensão durante os 35 ciclos da PCR e avaliaram em amostras de fezes e soro humanos. A sensibilidade dos *primers* foi de 1fg de DNA e quando testada frente ao DNA de outros helmintos (*A. lumbricoides*, *A. duodenale*, *T. solium*, e *T. trichiura*) não apresentou nenhuma amplificação. Quando comparada com o KK em amostras de fezes preparadas artificialmente, a PCR apresentou um melhor desempenho, amplificando as amostras que continham uma quantidade estimada de 216, 21,6 e 2,16 opg, enquanto que o KK amplificou apenas as duas primeiras amostras, quantificando erroneamente a segunda como contendo 48 opg. Além disso, a PCR conseguiu amplificar DNA extraído de fezes de seis indivíduos sabidamente positivos e com diferentes cargas parasitárias, bem como para três amostras de soro testadas. Nenhuma amostra negativa apresentou amplificação.

Carvalho et al. (2012) avaliaram a PCR desenvolvida por Pontes et al. (2002) em 219 amostras de fezes provenientes de duas localidades de baixa endemicidade em Minas Gerais, utilizando o KK como padrão-ouro. As taxas de positividade foram de 7,3% para o KK e de 34,7% para a PCR. Quando consideraram a especificidade de 100% para as técnicas (indivíduo considerado infectado se for positivo para uma das técnicas), a sensibilidade observada para o KK foi de 20,8% e para a PCR de 98,7%, obtendo um índice kappa de 0,234 (baixa concordância).

Enk et al. (2012) utilizaram os *primers* de Pontes et al. (2002) para avaliar a acurácia e aplicabilidade da PCR em detectar DNA de *S. mansoni* na urina de pacientes. Utilizaram um padrão ouro composto (KK + gradiente de salina + eclosão de miracídeos). Apresentaram

sensibilidade de 100%, especificidade de 91,2%, VPP 86,3% e VPN 100%, com uma acurácia de 94,3% e excelente concordância entre o padrão-ouro e a PCR (Índice Kappa = 0,8806).

Espírito-Santo et al. (2012) avaliaram um protocolo de reamplificação de PCR para detectar *S. mansoni* em amostras com baixa carga parasitária (menos de 100 opg). Todas as diluições testadas (5, 10, 20, 30 e 50 ovos/mL) foram amplificadas e a sensibilidade observada foi equivalente a cinco ovos/500mg de fezes artificialmente preparadas.

Tentando identificar DNA de *S. mansoni* em amostras de fezes de indivíduos provenientes de um município de baixa endemicidade no Ceará, Carneiro et al. (2013) modificaram a PCR descrita por Pontes et al. (2002), que consistiu na troca de uma base no primer reverso, e encontraram uma positividade em 68,4% (13/19) dos casos que tinham um teste parasitológico positivo (KK, Helmintex ou Gradiente salino), enquanto que o KK foi positivo em 31,6% (6/19) casos. Ao testar a PCR em amostras de pacientes negativos para *S. mansoni* e positivos para outros helmintos, a PCR apresentou amplificação em amostras de dois indivíduos com *T. trichiura* e um indivíduo com *Entamoeba histolytica/díspar*.

Lodh et al. (2013) compararam a eficácia do KK, CCA e PCR em diagnosticar *S. mansoni* em 89 amostras humanas. Antes da etapa de extração de DNA, as amostras de urina foram submetidas à um processo de filtração em papel filtro. Os primers utilizados foram os mesmos descritos por Pontes et al. (2002). Dentre as três técnicas estudadas, a PCR apresentou os melhores padrões (100% de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN), enquanto que o KK apresentou uma sensibilidade de 57%, especificidade e VPP de 100% e VPN de 23%, e o CCA teve sensibilidade de 67%, especificidade de 60%, VPP de 93% e VPN de 19%. Além disso, a PCR também foi a mais sensível em determinar a prevalência da doença (89%), comparada ao KK (51%) e CCA (60%).

Wichmann et al. (2013) realizaram um estudo multicêntrico em indivíduos que viajaram recentemente à países endêmicos para a esquistossomose mansônica e que apresentaram febre e eosinofilia. Os autores compararam os resultados do teste parasitológico (KK) com sorologia (ELISA e Imunofluorescência) e teste molecular (qPCR) desenvolvido pelo grupo de pesquisas (WICHMANN et al., 2009). A qPCR foi capaz de amplificar DNA presente no soro de 95% (35/37) dos pacientes, seguido pela sorologia (72%) e pelo parasitológico (25%).

Espírito-Santo et al. (2014) avaliaram a qPCR em amostras de fezes e soro humanos coletadas de moradores de uma região de baixa endemicidade localizada no Rio de Janeiro, Brasil, comparando esta técnica com dois métodos parasitológicos: o Kato-Katz e o Hoffman, Pons e Janer (HPJ). Os resultados obtidos foram de 0,9% (n =5/572) para os parasitológicos; 9,6% para a qPCR nas fezes (n =55/572) e 1,4% para a qPCR no soro (n =8/572). Observou-

se uma baixa concordância entre as técnicas parasitológicas e moleculares. Baseados nestes resultados e considerando como indivíduo infectado aquele que apresentou pelo menos um teste positivo, os autores estimaram para a qPCR nas fezes uma sensibilidade de 80%, especificidade de 92,4%, VPP de 8% e VPN de 99,8%, enquanto que a qPCR no soro apresentou 20% de sensibilidade, 98,8% de especificidade, 12,5% de VPP e 99,3% de VPN.

Lodh et al. (2014) utilizaram a PCR descrita por Pontes et al. (2002) e por Hamburger et al. (2001) para detectar o DNA de *S. mansoni* e *S. haematobium*, respectivamente, comparando com a técnica de KK (para *S. mansoni*) e a presença de hematúria (para *S. haematobium*). Eles submeteram as urinas de 86 pacientes ao mesmo método de filtração utilizado pelo grupo anteriormente (Lodh et al., 2013), e obtiveram uma sensibilidade de 99% para as PCR de *S. mansoni*, 100% *S. haematobium*, 76% para o KK e 30% para a hematúria. O VPN calculado foi de 92% para PCR de *S. mansoni*, 100% para PCR de *S. haematobium*, 38% para o KK e 25% para a hematúria. Todos apresentaram 100% de especificidade e VPP.

Abdel-Hafeez et al. (2015), seguiram o protocolo de PCR descrito por Pontes et al. (2002) para diagnosticar DNA *S. mansoni* em amostras de fezes de indivíduos que estavam na fase aguda ou crônica da doença, e comparou os resultados obtidos com a técnica de KK. O número de pacientes positivos pelo KK foi de 15/50 (30%) para indivíduos na fase aguda e de 6/70 (8.6%) para forma crônica. Enquanto isso, a PCR apresentou uma sensibilidade de 90% (45/50) para a fase aguda e de 97,1% (68/70) para a fase crônica da doença. Adicionalmente as duas técnicas foram testadas em amostras de indivíduos sadios e todos apresentaram resultados negativos para ambas.

Férrer et al. (2015) também utilizaram a PCR descrita por Pontes et al. (2002) para detectar DNA de *S. mansoni* em fezes de *hamster* e em amostras de soro de 86 pacientes com diagnóstico imunológico positivo. Ao otimizar a PCR, os autores obtiveram uma sensibilidade de 10ag, menor do que a encontrada por Pontes (1fg) e equivalente a menos de um OPG. A especificidade dos primers foi testada frente ao DNA de *Fasciola hepatica*, *T. solium*, *T. saginata*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* e DNA humano e nenhuma amplificação foi observada. Dos 86 pacientes testados, apenas 2 foram positivos pela PCR.

Meurs et al. (2015), avaliaram uma Multiplex-qPCR para identificar e quantificar DNA de *Schistosoma* spp. em amostras de fezes de 197 pacientes provenientes do Senegal e 760 pacientes do Kenya. Esta PCR tem como alvo o ITS-2 de *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. intercalatum*. A microscopia apresentou uma sensibilidade variada tanto para a população do Senegal (57,4-68,5%) quanto para a população do Kenya (19,2-29,5%), dependendo do

número de amostras analisadas, enquanto que a PCR foi realizada em apenas uma amostra por paciente e conseguiu amplificar DNA de *S. mansoni* em 72,6% das amostras provenientes do Senegal e de 32,4% para as amostras do Kenya. Todas as amostras de pacientes com carga parasitária de *S. mansoni* elevada foram positivas pela PCR, enquanto que aqueles com carga moderada variaram de 83-97%, e o grupo com baixa carga apresentou 79-87% de positividade.

Sady et al. (2015), tentaram detectar e diferenciar *S. mansoni* de *S. haematobium* em amostras de fezes e urina, analisando a curva de *melting* de alta resolução de uma qPCR que tem como alvo uma região do gene mitocondrial da subunidade I da citocrome oxidase (*cox1*). A qPCR foi 100% específica quando testada com DNA de outros parasitos e apresentou uma sensibilidade de 0,1pg quando testada com o DNA genômico de *Schistosoma*. Amostras de 400 crianças foram analisadas através da microscopia e 127 (31.8%) foram positivas para esquistossomose, sendo 95 (23.8%) diagnosticadas com a forma urogenital (através da urina), 37 (9.3%) com a forma intestinal (através das fezes) e 3.9% co-infectadas com as duas espécies de *Schistosoma*. Duas PCRs convencionais e uma qPCR foram aplicadas nessas amostras, todas amplificando regiões da *cox1* e apresentando sensibilidades de 82%, 91% e 100% nas amostras de urina e 83,8%, 91,9% e 100% para as amostras de fezes. Adicionalmente, quatro amostras de urina negativas pela microscopia e duas de fezes foram positivas pela qPCR. Por conta disso, as PCRs convencionais apresentaram especificidade e VPP das PCRS de 100%, enquanto que o VPN foi de 94,9- 98,7% para *S. haematobium* e de 98,4-99,2% para *S. mansoni*. Já a qPCR apresentou especificidades de 98.7% e 99.45% e um VPP de 95.9% e 94.9% para *S. haematobium* e *S. mansoni*, respectivamente, com um VPN de 100% para ambas.

Com o objetivo de comparar e avaliar três métodos de extração de DNA de amostras humanas (Salting out/resina, fenol-clorofórmio e kit comercial de extração), Sarhan et al. (2015) aplicaram a PCR desenvolvida por Pontes em amostras de soro e urina de um indivíduo sadio que foram artificialmente infectadas com *S. mansoni*, bem como em amostras de 20 indivíduos sabidamente positivos. Como resultado eles verificaram que o Kit comercial foi o único que conseguiu 100% de positividade para qualquer tipo de amostra testada. Já o método de Salting out/resina, apresentou 100% de positividade apenas para as amostras de urina, as de soro apresentaram 83,4% quando preparadas artificialmente e 75% nos pacientes. Os resultados da extração de fenol diferiram dos de Salting/out apenas nas amostras de soro proveniente de pacientes com 60% de positividade. Apesar disso, a extração realizada pelo método de Salting out/resina foi o que apresentou a melhor performance diagnóstica para as

amostras de urina artificialmente preparadas (considerando a densidade média dos produtos de PCR dosados após a extração), seguido pelo método de fenol-clorofórmio e por último pelo kit. O fenol clorofórmio foi o melhor método para as urinas obtidas de pacientes, seguido pelo salting out/resina. Nas amostras de soro infectadas artificialmente, o kit apresentou a melhor performance, ficando a resina em segundo lugar. Já nas amostras de soro de pacientes, o kit apresentou o pior resultado e os outros dois métodos apresentaram a mesma eficácia.

Schunk et al. (2015) avaliaram se o uso de “cartões fecais” são úteis para simplificar a coleta e o armazenamento de amostras de fezes para posterior detecção do DNA de *S. mansoni* por qPCR. A sensibilidade dos primers, quando testada em DNA genômico de *S. mansoni*, foi igual ou menor que 10 cópias do DNA. Em relação às amostras, os autores pegaram uma diluição de fezes em salina contendo 260 ovos/ml, realizaram uma diluição seriada de fator 4 (65 ovos/ml, 16 ovos/ml, 4 ovos/ml, 1 ovo/ml e 0.25 ovos/ml) e aplicaram a qPCR no DNA extraído a partir de 100ul de cada uma dessas diluições ou após 100ul das diluições terem passado pelos cartões fecais antes da extração. Para as amostras extraídas diretamente, o limite de detecção da qPCR foi de 1-4 ovos/mL, enquanto que o limite de detecção para as amostras passadas pelo cartão fecal foi de 64 ovos/mL. Ao avaliar amostras de fezes de 55 moradores de área endêmica, o KK conseguiu diagnosticar 63,6% (35/55) das amostras, enquanto que a qPCR foi capaz de diagnosticar 33 (94,3%) e 32 (91,4%) casos no DNA extraído diretamente ou com os cartões fecais, respectivamente.

Finalmente, Siqueira et al. (2015), utilizaram diferentes métodos parasitológicos e uma PCR-ELISA para o diagnóstico e avaliação de cura em amostras de fezes de 201 indivíduos provenientes de área de baixa endemicidade. A técnica de KK foi estudada analisando diferentes quantidades de lâminas, obtendo 16 amostras positivas (8%) ao utilizar 2 lâminas, 29 (14,4%) com 12 lâminas, ambas da mesma amostra, e 58 (28,9%) ao se analisar 18 lâminas (obtidas ao coletar 4 amostras de fezes do mesmo indivíduo). 32 (15,9%) amostras foram positivas pelo TF-Test® e 47 (23,4%) pela PCR-ELISA. A taxa de cura avaliada pelo KK foi de 100% após 30 e 90 dias de tratamento, e de 98,4% após 180 dias. Já para o PCR-ELISA, as taxas foram de 98,5%, 95,5% e 95,1% após 30, 90 e 180 dias, respectivamente.

É importante destacar que os métodos moleculares não podem substituir completamente o KK. Eles devem ser simplificados e possuírem uma melhor custo-efetividade, possibilitando o uso da técnica em larga escala. A aplicação destes métodos em áreas endêmicas ainda é limitada por necessitar de laboratórios bem equipados e técnicos capacitados para sua realização e para minimizar a possibilidade de resultados falso positivos devido à contaminação. Adicionalmente são necessários métodos de extração de DNA mais simples e

custo-efetivas que contribuam para um barateamento da técnica em relação aos métodos diagnósticos convencionais da doença (HE et al., 2016). Além disso, devido à um baixo retorno financeiro para as diversas empresas do ramo diagnóstico, os investimentos nestas técnicas estão cada vez menores e descontínuas, fazendo com que haja uma lentidão no desenvolvimento e consequente aplicação destas técnicas (PEELING; NWAKA, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar sistemas Nested-PCR para o diagnóstico de *S. mansoni* em caramujos e amostras biológicas humanas (sangue, urina e LCR).

3.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar os sistemas de PCR simples (quatro) e Nested-PCR convencional (duas) para a detecção de DNA de *S. mansoni*;
- b) Analisar a especificidade dos *primers* frente à cercária de ave e caracterizar a espécie através da técnica de RFLP.
- c) Estimar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do sistema de NPCR1 em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadros suspeitos de mielite esquistossomótica;
- d) Analisar a sensibilidade e especificidade da NPCR2 em amostras pareadas de sangue e urina e sua concordância entre as amostras positivas pelo teste de Kato-katz
- e) Avaliar a sensibilidade e especificidade da NPCR2 em amostras pareadas de sangue e urina de indivíduos não infectados pela *S. Mansoni*
- f) Avaliar a sensibilidade e especificidade do sistema NPCR2 em lotes de caramujos infectados experimentalmente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo compreendeu duas etapas: uma de otimização de sistemas de PCR simples e Nested-PCR e outra de avaliação do desempenho dos dois sistemas Nested-PCR em amostras humanas e de caramujos. A acurácia da NPCR1 foi avaliada em amostras de LCR, enquanto que a NPCR2 foi utilizada para avaliar a presença de DNA de *S. mansoni* em amostras de sangue e urina humanos e de caramujos.

4.1 Otimização das PCRs

Para o desenvolvimento do sistema de Nested-PCR, foram inicialmente otimizadas quatro PCRs simples utilizando DNA purificado de *S. mansoni*. Em seguida, foram desenvolvidos os ensaios de padronização da Nested-PCR convencional.

4.1.1 Extração e purificação do DNA genômico de *S. mansoni*

Os vermes adultos de *S. mansoni* foram cedidos pelo Serviço de Referência de Esquistossomose (SRE) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) e sua extração de DNA foi realizada utilizando o método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Posteriormente, esse DNA foi quantificado através do equipamento Nanodrop 2000c (ThermoScientific) e utilizado para preparação de uma curva de diluição seriada (0,5ng - 0,05fg) para avaliar o limite de detecção dos sistemas de PCR.

4.1.2 PCRs Simples

Foram otimizados quatro ensaios de PCRs simples, todos utilizando *primers* que amplificam a região 18S do DNA ribossômico (DNAr) de *S. mansoni*: (i) *primers* Unvfo2 (senso: TGGAGGGCAAGTCTGGTG) e Schre19 (anti-senso: CTAAACGAGCACAGAGGAC); (ii) *primers* Schfo17 (senso: GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC) e Unvre6 (anti-senso: GGTGAGTTTTCCCGTGTTGAGT); (iii) *primers* Schfo11 (senso: GTTACGATCAGGACCAGTGT) e Unvre16 (anti-senso: CCGGACATCTAAGGGCATCA); e por último (iv) os *primers* Schfo17 (senso:

GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC) e Schre19 (anti-senso: CTAAACGAGCACAGAGGAC) (MELO et al., 2006).

As PCRs foram otimizadas testando-se diferentes concentrações de primers (1, 5, 10, 20 e 50 pmols) e de magnésio (0.8, 1.0 e 1.5 mM). A mistura reacional foi composta por KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8.3, dNTP 0,2 mM (Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA), e 2,5 unidades de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen). Todas as reações continham água como controle negativo e foram realizadas em um volume final de 50 µL. A ciclagem para cada par de primer segue como descrito no Quadro 3.

Quadro 3 – Primers e ciclagem dos sistemas de PCRs simples

Primer	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Ciclos
Unvfo2 e Unvre 19	92°C por 5 minutos	92°C por 30 segundos	65°C por 1 minuto	75°C por 1 minuto	72°C por 5 minutos	30 ciclos
Schfo 11 e Unvre 16			56°C por 1 minuto			
Schfo 17 e Unvre 6			58°C por 1 minuto			
Schfo 17 e Schre 19						

Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.3 Nested PCR convencional (NPCR)

Os quatro sistemas de PCR simples foram combinados em duas reações sequenciais diferentes, caracterizando as Nested PCRs (Quadro 4). As condições de ciclagem utilizadas para as duas NPCRs foram as mesmas utilizadas para as PCRs simples descritas no item anterior.

Quadro 4 - Formação das Nested-PCR de acordo com os primers

Nested-PCR	Primers externos/internos
NPCR1	Schfo 11 e Unvre 16/ Schfo 17 e Schre 19
NPCR2	Schre 19 e Unvfo 2 /Schfo 17 e Unvre 6

Fonte: Elaborado pelo autor

Foram testadas as concentrações 50, 40, 30, 20, 10, 5 e 1pmol de primers externos. Enquanto que, para os primers internos, foram testadas as concentrações de 20 e 50pmols. Dois microlitros do produto amplificado pelos primers externos serviram como molde para os primers internos.

4.1.4 Análise da sensibilidade e especificidade dos sistemas de PCR

Para avaliação da sensibilidade (limite de detecção) dos *primers* foi construída uma curva de diluição a partir de quantidades conhecidas de DNA genômico purificado de *S. mansoni*, efetuando-se diluições seriadas de fator 10 nas seguintes concentrações: 0,5 ng/μl, 50 pg/μl, 5 pg/μl, 0,5 pg/μl, 50 fg/μl, 5 fg/μl, 0,5 fg/μl, 0,05 fg/μl, objetivando saber qual a menor concentração de DNA que as técnicas foram capazes de amplificar. Foram utilizados 2 μl de cada concentração.

A especificidade dos *primers* utilizados nos sistemas de NPCR foi testada utilizando DNA genômico de cercárias de ave, identificadas ao microscópio por um técnico experiente do Serviço de Referência em Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (SRE/CPqAM-FIOCRUZ). A extração e purificação de DNA das cercarias de ave foram realizadas com o kit comercial ILLUSTRATE Tissue&cells genomicPrep mini spin KIT (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as recomendações do fabricante. Dois microlitros do obtido DNA foram utilizados para cada sistema.

Adicionalmente, estes produtos de PCR foram submetidos à testes de Sequenciamento e de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), com o intuito de auxiliar na distinção entre as espécies.

4.1.4.1. Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR obtidos após a amplificação das cercárias de ave foram purificadas segundo as condições recomendadas pelo kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI) e submetidas à sequenciamento.

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE, com o Kit comercial ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante, e processados no equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Para a reação, foram utilizados os seguintes componentes : 1 μl do primer 19/2 (3,2 pmol/μl), 0,5 μl de Bigdye® Terminator v3.1, 1 μl de Tampão de sequenciamento 5x (Tris-HCl, pH 9.0 200 mM, MgCl₂ 5 mM), 1 μl do produto de PCR purificado (20 ng/μL) e água MilliQ 10 μl q.s.p. O programa de amplificação seguiu a seguinte ciclagem: 1 ciclo a 94° C

por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. Para cada amostra foram realizadas 2 reações, sendo uma para o primer forward e outra para o reverso. Após amplificação, foi realizada a purificação/precipitação de DNA: ao volume total da reação de sequenciamento (10 µL) foi adicionado 2,5µL de EDTA (125mM, pH 8,0) e 25µL de etanol 100%. Após mistura em vórtex, a reação foi centrifugada a 3700 rpm por 45 minutos. O precipitado da reação foi lavado com 70 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 3700 rpm por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi solubilizado em 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e aplicado no sequenciador automático.

Os dados gerados do sequenciamento das amostras foram submetidos à ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e comparados às sequências armazenadas no GenBank, um banco de dados públicos do National Center for Biotechnology Information - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) que armazena e fornece dados de sequências de DNA de aproximadamente 260 mil espécies (BENSON et al., 2013).

4.1.4.2 Análise de fragmentos polimórficos por enzimas de restrição

Para auxiliar na distinção entre o *S. mansoni* e a cercária de ave, utilizamos inicialmente o programa ApE plasmid, um editor de plasmídeos que permite fazer uma digestão virtual do DNA avaliando os sítios de corte de diferentes enzimas de restrição em uma sequência de DNA alvo e demonstrando o seu padrão de bandas resultantes. Este programa foi aplicado nos contigs gerados no sequenciamento para as duas espécies de cercárias estudadas e o padrão de bandas gerado foi analisado.

Adicionalmente, em laboratório, os produtos de PCR destas cercárias foram submetidos à técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*), utilizando enzimas de restrição para digerir o DNA e formar bandas com tamanhos diferentes, permitindo a distinção entre as cercárias. Para isso, foram testadas as enzimas Hae III (Invitrogen) e HhaI (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

4.1.5 Análise e registro dos resultados da avaliação da sensibilidade e especificidade dos sistemas

Dez microlitros dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 3% (apenas para os produtos obtidos após a etapa da RFLP) ou 2% (para os

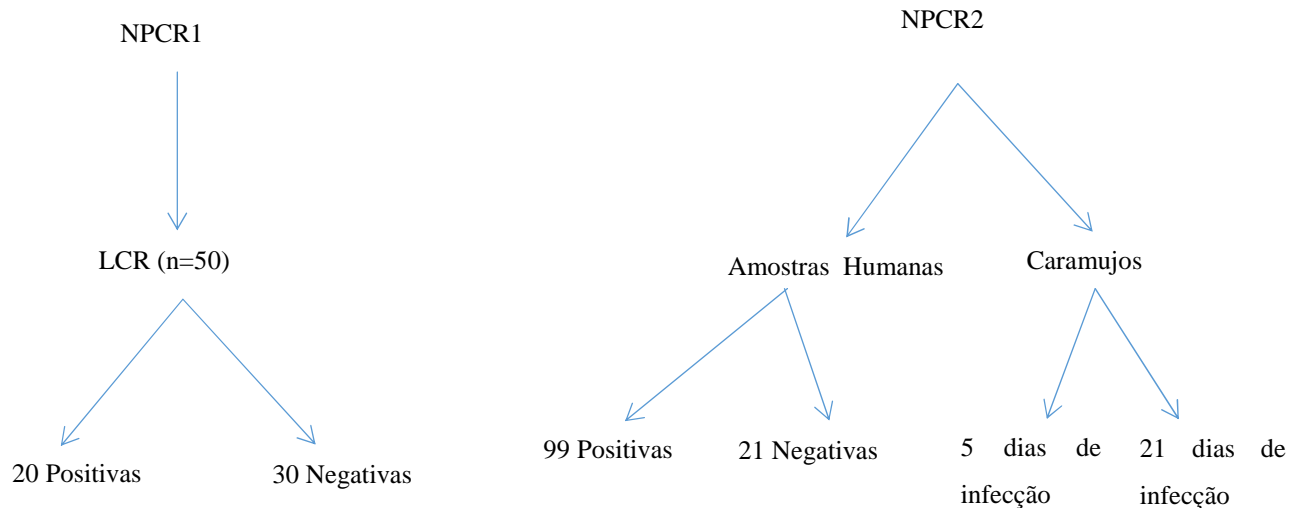
produtos restantes) com coloração pelo brometo de etídio de acordo com metodologia padronizada (SAMBROOK et al., 1989) e/ou utilizando 2 µL do corante blue green para cada amostra. As bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas através de um sistema de fotodocumentação.

4.2 Avaliação dos sistemas de NPCR

4.2.1 Avaliação nas amostras humanas

As Nested-PCRs estudadas foram avaliadas em diferentes amostras biológicas, conforme indicado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da realização das Nested-PCR nas amostras humanas



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.1.1 Seleção das amostras

As NPCRs foram avaliadas em amostras de LCR, sangue, urina e fezes humanas.

4.2.1.1.1 LCR

Para a avaliação do sistema NPCR1 foram selecionadas amostras de LCR de 50 indivíduos com quadro suspeito de mielite esquistossomótica, dos quais 20 tiveram

diagnóstico confirmado de esquistossomose com base nas manifestações clínicas (dor torácica baixa ou lombar, comprometimento motor e disfunção urinária) associados com evidência de inflamação no cordão espinhal confirmada pela análise do LCR e pelo exame da ressonância magnética. A evidência de exposição destes indivíduos à *Schistosoma* foi confirmada por um teste ELISA positivo no soro ou LCR, presença de ovos nas fezes ou biópsia retal. Os 30 casos restantes tiveram o diagnóstico de esquistossomose descartados e foram diagnosticados com outras etiologias mielíticas. Essas amostras foram oriundas de pacientes assistidos na enfermaria do Departamento de Neurologia do Hospital da Restauração de Recife/PE.

A coleta das amostras de LCR foi realizada em um estudo anterior (“Utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase no líquido cefalorraquiano para diagnóstico da mielorradiculopatia esquistossomótica”) sob responsabilidade do MSc. Igor Silvestre Bruscky. As amostras foram transportadas em gelo seco até o Laboratório de Doenças Transmissíveis do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (LDT/CPqAM/FIOCRUZ), onde foram armazenadas a -20° até o seu processamento.

As amostras foram extraídas e purificadas utilizando o kit comercial Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, UK), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA obtido foi avaliado pela NPCR1 otimizada.

4.2.1.1.2 Sangue e urina

Para a avaliação do sistema NPCR2 foram selecionadas amostras de sangue e urina de indivíduos (n=99) com diagnóstico de esquistossomose confirmado pela técnica de Kato-Katz, de qualquer sexo e idade, identificados em um inquérito realizado pelo Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas (projeto SANAR), no estado de Pernambuco (PERNAMBUCO, 2012) e de indivíduos (n=21) residentes em áreas não endêmicas, sem história de contato com coleções hídricas suspeitas de contaminação por *S. mansoni* e negativos pelos exames de amostras de fezes pelo método Kato-katz (duas amostras).

Amostras de sangue (5 mL) e urina (50mL) foram coletadas dos indivíduos após a aplicação de um questionário para obtenção de informações sobre contato prévio com coleção de águas contaminadas e tratamento anterior para esquistossomose (Apêndice A e B).

As amostras de sangue e urina também foram processadas no LDT/CPqAM/FIOCRUZ. Quando não foi possível o processamento imediato das amostras, as amostras de sangue foram mantidas em geladeira enquanto que as de urina foram mantidas a -20°C.

A extração e purificação de DNA das amostras de sangue foram realizadas com o kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

A extração do DNA nas amostras de urina foi feita pelo método de fenol-clorofórmio modificado (SILVA et al., 2014). Resumidamente, 5mL de urina foram transferidas para um tubo falcon de 15mL, acrescidas com o dobro do volume de etanol absoluto e centrifugadas à 5000 rpm por 10 minutos. Para cada amostra o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 700µL solução de lise (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; SDS 0,5%) e 20µL de Proteinase K (20mg/mL). A extração procedeu da mesma forma que a utilizada para os caramujos, modificando apenas a etapa de clorofórmio (que foi realizada duas vezes), e a centrifugação (11000 rpm por 1 minuto para as primeiras etapas e 11000rpm por 3 minutos para a etapa do álcool isopropílico). O pellet obtido foi ressuscitado em 20µL de água Milli-Q autoclavada e armazenada à 20°C até a sua avaliação pela NPCR2 otimizada.

4.2.1.1.3 Fezes

Amostras de fezes de 21 indivíduos moradores de áreas não endêmicas foram coletadas e transportadas até o LDT/CPqAM/FIOCRUZ sob refrigeração, apenas para serem processadas e analisadas por técnico com experiência na realização da técnica, utilizando o Coprokit Kato-Katz® (Campinas medical) que foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. para a realização da técnica de Kato-katz e exclusão da infecção por *S. mansoni*. As amostras dos indivíduos com diagnóstico confirmado de esquistossomose foram processadas e analisadas no Laboratório do Núcleo de Esquistossomose e Filariose da secretaria de Saúde do município de Jaboatão e no Laboratório de Controle da Esquistossomose do município Cabo de Santo Agostinho.

Resumidamente, uma pequena quantidade de fezes foi retirada do recipiente com o auxílio de uma espátula e colocada sobre uma folha de papel absorvente. Em seguida, uma tela foi colocada sobre a amostra e comprimida com espátula, fazendo com que parte das fezes passasse através da malha. Em seguida, o material filtrado foi coletado e depositado no orifício de uma placa perfurada posicionada sobre uma lâmina de vidro. Após encher completamente o orifício e retirar o excesso de fezes, a placa foi removida e, em seguida, uma lamínula embebida previamente por 24h em solução verde malaquita foi colocada sobre o material. Posteriormente, essa lâmina foi invertida e pressionada com o polegar sob uma superfície lisa fazendo com que o material se espalhasse até obter uma uniformidade do

material. Por fim, após um repouso de uma hora em temperatura ambiente, a lâmina foi levada ao microscópio para leitura e quantificação dos ovos. Foram realizadas duas lâminas por amostra de fezes do paciente.

4.2.2 Avaliação nas amostras de caramujo

Caramujos da espécie *B. glabrata* sabidamente negativos e criados no Laboratório do Serviço de Referência em Esquistossomoses do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) foi analisado. Destes, 110 caramujos foram selecionados aleatoriamente, individualmente expostos a 5-10 miracídios de *S. mansoni* e incubados em temperatura ambiente, de acordo com o descrito por Malek e Rouquayrol (1986). Estes caramujos foram divididos em 2 grupos de acordo com os dias de infecção: 55 caramujos coletados no 5º dia após a infecção e 55 coletados no 21º dia após-infecção. Foram numerados lotes de 1 a 10, contendo um total de 50 caramujos em cada lote (somando os caramujos infectados e não infectados). O número de caramujos infectados em cada lote foi aumentado gradualmente, iniciando-se com apenas um caramujo infectado e 49 não infectados no 1º lote, até um total de dez caramujos infectados e 40 não infectados no 10º lote. Como controle do experimento existiu um lote adicional (11º lote) para cada grupo contendo 50 caramujos sabidamente não infectados, como demonstrado no Quadro 5.

Quadro 5 – Distribuição dos lotes e quantidades de caramujos positivos e negativos presentes em cada lote dos grupos 1 e 2.

Lote	Quantidade de caramujos positivos	Quantidade de caramujos negativos	Total de caramujos
1º lote	1	49	50
2º lote	2	48	50
3º lote	3	47	50
4º lote	4	46	50
5º lote	5	45	50
6º lote	6	44	50
7º lote	7	43	50
8º lote	8	42	50
9º lote	9	41	50
10º lote	10	40	50
11º lote	0	50	50

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.2.1 Extração e purificação do DNA dos caramujos

Inicialmente, visando mimetizar a extração de DNA de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata*, um total de 150 caramujos foram separados em 3 tubos tipo Falcon de 50mL contendo 50 caramujos cada e submetidos à maceração utilizando um bastão de vidro. Após esta etapa, foram adicionadas quantidades conhecidas de DNA de *S. mansoni* (1ng, 10pg e 10fg, respectivamente) e então estes foram submetidos à extração de DNA pelo método de fenol clorofórmio.

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. Resumidamente, os caramujos foram macerados, homogeneizados e suspensos em solução de lise (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; SDS 0,5%) e Proteinase K (20mg/ml). Após incubação a 60 °C durante 1 hora, um volume igual de fenol foi adicionada à solução, homogeneizada, centrifugada a 5000 rpm por 7 minutos e a fase aquosa foi então retirada e adicionada em um novo tubo. Volumes iguais de fenol-clorofórmio (1:1) e clorofórmio foram utilizados consecutivamente para extração, sempre reaproveitando a fase aquosa de uma etapa para outra. As mesmas condições de rotação e tempo supracitados foram mantidas. Então, após separação da fase aquosa da etapa de clorofórmio, adicionou-se álcool isopropílico gelado em igual volume e essa mistura foi armazenada à -20°C overnight. Por fim, essa amostra foi centrifugada a 11000 rpm por 1 minuto e o pellet obtido foi ressuspensionado em 2mL de água Milli-Q autoclavada e armazenada à -20°C até o seu uso.

4.2.2.2 Processamento e análise das amostras de caramujos

Para o experimento de mimetização, apenas 2µL do DNA obtido após a extração de cada uma das concentrações (1ng, 10pg e 10fg) foi avaliado. Já para o DNA extraído dos lotes de caramujos, foram testadas diferentes diluições do DNA (1:10, 1:100 e 1:1000), onde 2 µL foram avaliadas. O lote de controle negativo foi utilizado para avaliar a especificidade. Todos esses experimentos foram avaliados utilizando a NPCR2

4.2.3 Análise dos dados

4.2.3.1 Amostras humanas

Realizou-se a análise descritiva das principais características dos indivíduos cuja coleta de sangue e urina foi realizada, além dos casos de mielite cujas amostras de LCR foram coletadas. A carga parasitária nas amostras de fezes foi medida pela quantidade de ovos por grama de fezes (opg) e determinada pelo cálculo da soma dos ovos de *S. mansoni* encontrados em cada lâmina, dividido pelo número de lâminas examinadas por pessoa e multiplicado por 24 (KATZ; CHAVES; PELEGRINO, 1972). A carga parasitária das amostras foi classificada em alta (>400 opg), média (100-300 opg) e baixa (<100 opg), de acordo com o critério da Organização Mundial de Saúde (2009).

As NPCR otimizadas foram avaliadas utilizando o DNA extraído dos fluidos biológicos humanos. A realização e interpretação dos resultados do teste foram feitos de forma cega (sem conhecimento do status de infecção dos indivíduos) para se evitar o viés do observador. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma banda diagnóstica padrão para o sistema de NPCR (de acordo com o observado na etapa de otimização) e a ausência desta banda caracterizou um resultado negativo.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da NPCR1 foram determinadas nas 50 amostras de LCR em relação ao padrão ouro (relatado na etapa de coleta de amostras).

A sensibilidade da NPCR2 foi avaliada no DNA obtido das amostras de sangue e urina de indivíduos positivos pelo Kato-katz. Já a especificidade foi avaliada nas amostras dos indivíduos sem infecção (negativos pelo Kato-katz, residentes em áreas não endêmicas e sem história de contato com coleções hídricas suspeitas de contaminação pela *S. mansoni*), ou seja, verificou-se a proporção de resultados negativos pelo NPCR2. Em seguida, analisou-se a concordância entre os resultados da NPCR2 nas amostras pareadas de sangue e urina dos indivíduos com diagnóstico parasitológico confirmado de esquistossomose pelo cálculo do índice Kappa. Valores de índices de kappa menores do que 0,20 foram classificados com concordância ruim; fraca, entre 0,21 - 0,40, moderada, entre 0,41 - 0,60; boa, entre 0,61 - 0,80 e excelente, quando maior que 0,81 (LANDIS; KOCH, 1977).

4.2.3.2 Amostras de caramujo

As amostras foram analisadas de acordo com as diluições do DNA (1:100, 1:100 e 1:1000) obtido a partir da extração de cada lote de caramujo, sendo considerados positivos aquelas diluições que apresentaram a banda diagnóstica esperada para a NPCR2, e negativas as que não apresentaram nenhuma amplificação.

4.3 Considerações éticas

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa obedeceram à resolução do Conselho Nacional de Saúde n. 466 de 12 de dezembro 2012, que regulamenta as diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos.

O projeto contou com o apoio das autoridades locais de saúde e foi aprovado (CAEE: 16096413.5.0000.5190) pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (Anexo A). A obtenção das amostras de LCR foi autorizada pelo projeto “Utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase no líquido cefalorraquiano para diagnóstico da mielorradiculopatia esquistossomótica” (CAEE: 14308713.4.0000.5198) sob responsabilidade do pesquisador Igor Silvestre Bruscky.

4.4 Limitações do estudo

4.4.1 Amostras humanas

Como principal limitação observada pode-se citar o fato de se ter utilizado apenas uma técnica diagnóstica (Kato-katz) para exclusão da doença nos indivíduos negativos. Assim, embora não houvesse história de exposição prévia ao parasito entre os indivíduos classificados como livres de infecção, não é possível afastar definitivamente a possibilidade de infecção pelos métodos parasitológicos. Esse problema pode gerar resultados que seriam interpretados como falso-negativos, caso algum desses indivíduos estivesse infectado. Além disso, podemos acrescentar o fato de não se ter nenhuma informação sobre o estágio evolutivo da doença, o que pode interferir na acurácia do teste. Outra limitação observada está no número restrito de amostras de sangue e de urina de indivíduos sem infecção devido à dificuldade de se obter amostras de pessoas saudáveis.

4.4.2 Amostras de caramujos

Quanto à avaliação nos caramujos, uma das limitações foi o fato de não ter sido possível confirmar a infecção pela técnica de exposição à luz, que geralmente é realizada após os 30 dias de infecção, devido ao período do ciclo evolutivo do parasito no caramujo para a liberação das cercarias. Como o exame dos caramujos foi realizado em um período inferior a 30 dias, não foi possível se confirmar a infecção dos caramujos expostos aos miracídeos, podendo ter ocorrido erros de classificação diagnóstica ao formar os lotes estudados.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização dos sistemas de PCR simples

As melhores condições encontradas para as quatro PCRs simples estudadas estão dispostas no quadro 6.

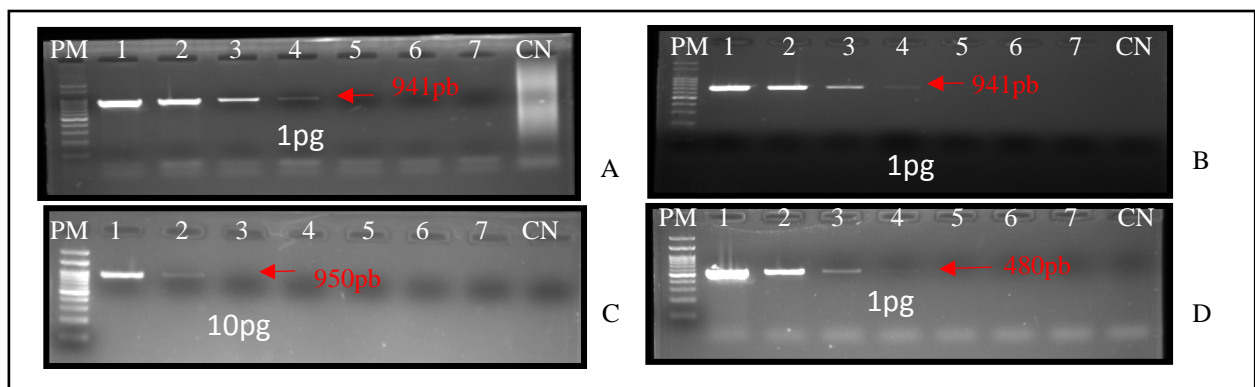
Quadro 6 – Condições de cloreto de magnésio e *primers* das PCRs simples após otimização

<i>Primers</i>	Concentração de cloreto de Magnésio	Concentração de <i>Primers</i>	Tamanho aproximado das bandas
Schfo11/Unvre16	1,5mM	10 pmols	941 pb
Schfo17/Unvre19	1,5mM	50 pmols	721 pb
Unvfo2/Unvre19	1,5mM	5 pmols	926 pb
Schfo17/Unvre6	1,5mM	20 pmols	480 pb

Fonte: Elaborado pelo autor

Os limites de detecção encontrados foram de 1pg para os *primers* 11/16, 17/19 e 17/6. Enquanto que os *primers* 2/19 obtiveram apenas 10pg de sensibilidade (Figura 6).

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos das PCRs simples utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de *S. mansoni*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: A – Primers Schfo11 e Unvre16. B – Primers Schfo17 e Schre19. C – Primers Unvfo2 e Unvre19. D – Primers Schfo17 e Unvre6. PM - Peso Molecular (100 pb Ladder); 1 – 1ng; 2 – 100pg, 3 – 10pg, 4 – 1pg, 5 – 100fg, 6 – 10fg, 7 – 1fg, CN – Controle Negativo.

5.2 Otimização dos sistemas de Nested PCR

As concentrações otimizadas para as Nested PCRs estão relatadas no quadro 7.

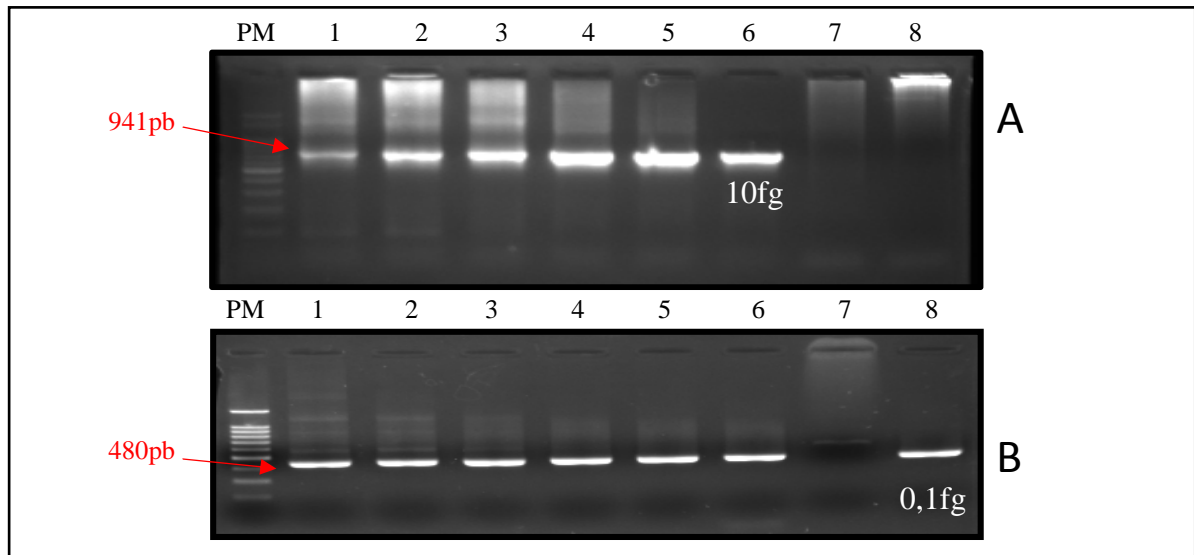
Quadro 7 – Condições de cloreto de magnésio e primers das Nested PCR após otimização

Sistemas	Concentração cloreto de magnésio	Concentração de <i>primers</i>	Tamanho aproximado das bandas
NPCR1	1,5mM	10 pmols Primers externos + 50 pmols Primers internos	941 pb
NPCR2	1,5mM	5 pmols Primers externos + 20 pmols de primers internos	480 pb

Nota: Elaborado pelo autor

Os limites de detecção encontrados para as Nested PCR foram de 10fg para a NPCR 1 e 0,1fg para a NPCR 2. (Figura 7).

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos das Nested PCR utilizando diferentes quantidades de DNA genômico de *S. mansoni*.



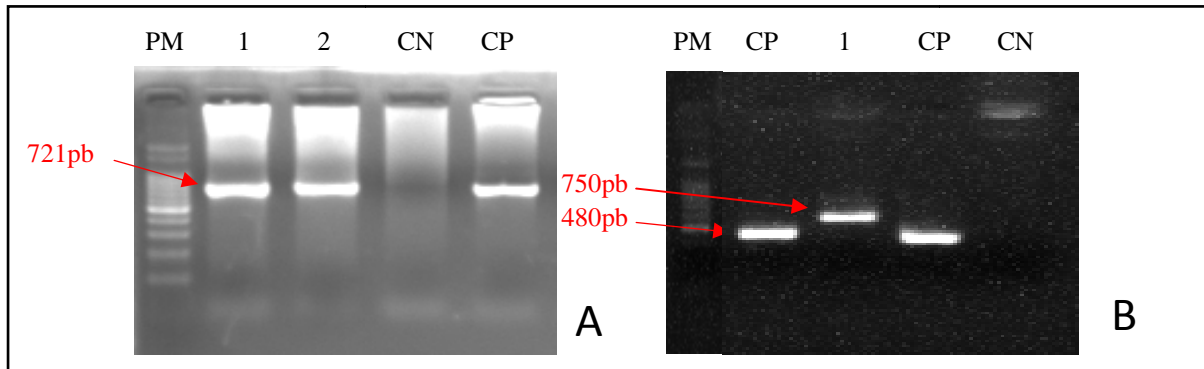
Nota: Elaborado pelo autor.

Legenda: A – NPCR1. B – NPCR2. PM - Peso Molecular (100 pb Ladder); 1 – 1ng; 2 – 100pg, 3 – 10pg, 4 – 1pg, 5 – 100fg, 6 – 10fg, 7 – 1fg, 8 – 0,1fg.

5.3. Avaliação da Especificidade dos sistemas de Nested PCR

Ao testar as duas NPCRs otimizadas observou-se que ambas amplificaram o DNA de cercarias de ave porém, na NPCR1, o tamanho da banda foi o mesmo que o de *S. mansoni* (721 pb), não sendo possível a distinção entre as espécies. No sistema NPCR2, as bandas referentes à amplificação do DNA de *S. mansoni*, foram de tamanho diferente das demais cercarias, demonstrando que este sistema é capaz de diferenciar as espécies de cercarias estudadas, gerando uma banda de aproximadamente 480 pb para *S. mansoni* e 750 pb para a cercaria de ave (Figura 8).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a especificidade das Nested PCRs frente ao DNA de cercaria de ave.



Fonte: Elaborado pelo autor

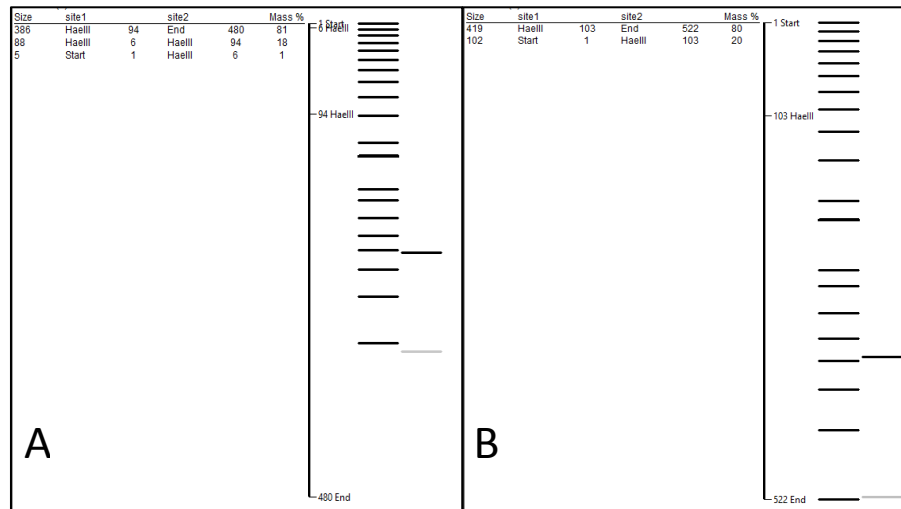
Legenda: A – NPCR1. B – NPCR2. PM - Peso Molecular (100 pb Ladder); 1 e 2- cercaria de ave. CP – Controle Positivo (1ng de DNA de *S. mansoni*). CN – Controle negativo.

5.3.1 Sequenciamento e RFLP

Os amplicons obtidos pelo sistema de NPCR2 para a cercaria de ave foram purificados, sequenciados e analisados quanto à semelhança com outras espécies através do banco de dados do GenBank (NCBI), obtendo 98% de identidade com espécies de cercarias ave (*Ornithobilharzia canaliculata*; *Austroilharzia* sp.; *Austroilharzia terrigalensis*), cão (*Heterobilharzia americana*), tartarugas (*Heterobilharzia americana*) ou roedores (*Schistosomatium douthitti*). Também foi observado 97% de identidade para a subunidade menor de RNAr de *S. mansoni*.

Através do programa ApE plasmid foi possível observar que as enzimas de restrição que geram um melhor padrão de bandas distinguíveis entre *S. mansoni* e a cercaria de ave foram a *HaeIII* (Figura 9) e *Hhai* (Figura 10). Para a enzima *HaeIII*, o programa gerou bandas de 386, 88 e 5 pb para a cercaria de ave e de 419 e 102pb para *S. mansoni*. Por sua vez a enzima *Hhai* gerou bandas de 365 e 114 pb para a cercária de ave e apenas uma banda de 521pb para *S. mansoni*.

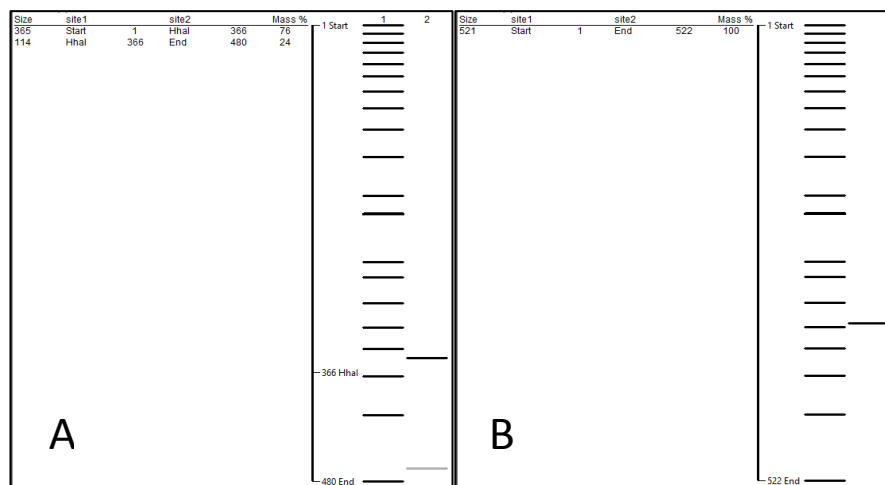
Figura 9 – Padrão de bandas gerados para os produtos de sequenciamento utilizando a enzima *HaeIII* no programa ApE plasmid.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A – cercaria de ave; B – *S. mansoni*.

Figura 10 – Padrão de bandas gerados para os produtos de sequenciamento utilizando a enzima *HhaI* no programa ApE plasmid.

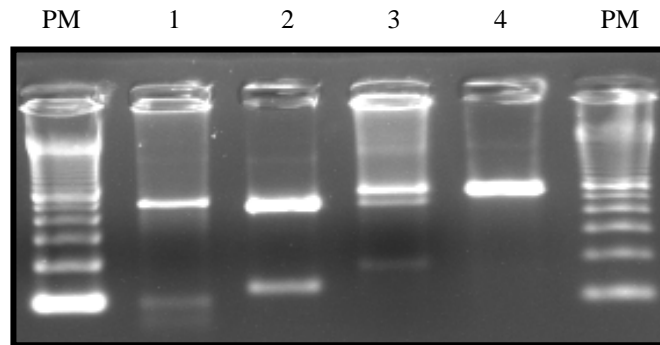


Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A – *S. mansoni*; B – cercaria de ave.

Como estas duas enzimas foram as que apresentaram melhores distinções de bandas, elas também foram aplicadas em laboratório através da realização da técnica de RFLP e permitiram uma distinção entre as cercárias (Figura 11), sendo a enzima *HhaI* a que apresentou um melhor resultado por conseguir gerar três bandas (aproximadamente 600, 500 e 180 pb) para a cercaria de ave e apenas uma banda de 600 pb para *S. mansoni*.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o padrão de bandas obtidos após a RFLP.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: PM - Peso Molecular (100 pb Ladder); 1- cercaria de ave digerida pela *HaeIII*; 2 – DNA de *S. mansoni* digerido pela *HaeIII*; 3 - cercaria de ave digerida pela *Hhai*; 4 – DNA de *S. mansoni* digerido pela *Hhai*.

5.4 Avaliação dos sistemas de NPCR em amostras

5.4.1 Avaliação do sistema NPCR1 em amostras de LCR de casos suspeitos

Quanto às características dos casos de mielite secundária ou não à infecção esquistossomótica, cujas amostras de LCR foram testadas pela NPCR1 (Quadro 8), a média de idade dos casos confirmados de neuroesquistossomose foi $35,5 \pm 13,0$ e dos casos sem esquistossomose foi de $41,3 \pm 17,1$. Quanto ao sexo, observou-se que 60% (12/20) dos casos confirmados e 50% (15/15) entre as mielites por outras etiologias eram do sexo feminino. Quanto à duração dos sintomas, observou-se uma média de $6,3 \pm 4,9$ dias.

A NPCR 1 foi positiva em 80% (16/20) dos casos e negativa em todos os controles (30/30), observando-se uma sensibilidade de 80% (IC de 95%: 56.3–94.2), uma especificidade de 100% (IC de 95%: 88.4–100), valor preditivo positivo de 100% (95% IC: 79.4–100) e valor preditivo negativo de 88% (IC de 95%: 72.5–97) e acurácia de 92%. Entre os casos, metade das amostras (10/20) foram positivas pelo teste ELISA.

Quadro 8 – Características epidemiológicas e resultados da NPCR1 e ELISA em pacientes confirmados para neuroesquistossomose

Paciente	Idade	Sexo	NPCR1	ELISA	Biópsia Retal	Duração dos Sintomas (dias)
1	19	F	P	P	NR	4
2	28	M	P	P	NR	3
3	27	F	P	N	P	5
4	51	M	P	N	P	5
5	20	F	P	P	NR	2
6	45	F	N	N	P	15
7	24	F	P	N	P	9
8	48	M	P	P	NR	2
9	27	F	P	N	P	10
10	18	F	P	N	P	3
11	33	F	P	N	P	4
12	42	M	N	N	P	14
13	52	M	P	P	NR	3
14	60	M	P	N	P	4
15	27	F	P	P	NR	4
16	25	F	P	P	NR	5
17	26	M	N	N	P	16
18	40	F	P	P	NR	1
19	52	M	N	P	NR	14
20	45	F	P	P	NR	2

Nota: Elaborado pelo autor

Legenda: F = feminino; M = masculino; P = positivo; N = negativo; NR = Não realizado

5.4.2 Avaliação do sistema NPCR2 nas amostras humanas de sangue e urina

A tabela 1 apresenta as principais características dos indivíduos com (n=99) e sem infecção (n=21), cujas amostras de sangue e urina foram testadas pela NPCR2. Em relação aos infectados, cerca de 50% dos indivíduos era do sexo feminino, possuía idade média de $33,4 \pm 16,7$ e carga parasitária que variou entre 24 -4368 OPG (mediana= 24 OPG). Quanto aos negativos, a média da idade foi de $28,3 \pm 15,1$ e cerca de 70% (71,4%) era sexo feminino.

Tabela 1- Características dos indivíduos com e sem infecção por *S. mansoni* com amostras de sangue e urina testadas na avaliação do sistema NPCR 2.

Características	Infecção por <i>S. mansoni</i>			
	Caso (n=99)		Controle (n=21)	
Idade , média±dv	n	Média ±desvio	n	Média ±desvio
0 – 19 anos	24	15,54 ± 3,34	6	13,0 ± 4,2
> 19 anos	75	39,17 ± 15,16	15	35,0 ± 15,0
Sexo, n (*%)				
Masculino	49	49,5	6	28,6
Feminino	50	50,5	15	71,4
Carga Parasitária (opg), mediana (intervalo)	99	24 (24 – 4368)	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Entre 99 amostras de sangue de indivíduos infectados, 25 (25,3%) foram positivas pela NPCR2, enquanto que entre 21 amostra de sangue de indivíduos não infectadas, 5 (23,8%). Em relação às amostras de urina, entre as 99 amostras de indivíduos infectados, 47 (47,5%) foram positivas e 52 (52,5%) foram negativos. Entre os 21 não infectados, cinco amostras (23,8%) foram positivas e 16 (76,2%) foram negativas.

Entre as 86 amostras de indivíduos infectados com baixa carga parasitária (1-99 OPG), 23 (26,7%) foram positivas e 63 (73,3%) negativas nas amostras de sangue, enquanto que entre as amostras de urina, 39 (45,3%) foram positivas e 47 (54,7%) foram negativas.

Para os oito casos de indivíduos com média carga parasitária (100-399 OPG), apenas um caso (12,5%) foi positivo em amostras de sangue, sendo os outros sete casos (87,5%) negativos, enquanto que metade das amostras de urina foram positivas.

Para os cinco casos de indivíduos com alta carga (>400 opg), apenas um caso (20%) foi positivo e quatro (80%) foram negativos nas amostras de sangue, enquanto que para as amostras de urina, quatro casos (80%) foram positivos e apenas um (20%) foi negativo.

Comparando-se os resultados da NPCR2 em amostras de sangue e urina, obtivemos uma concordância fraca (índice kappa= 0,21 - IC 95% = 0,04-0,39) e uma positividade quase duas vezes maior para as amostras de urina (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação dos resultados da NPCR2 em amostras de sangue e urina em pacientes sabidamente positivos

		Urina			Índice Kappa
		Positivo	Negativo	Total	
Sangue	Positivo	17	8	25	0,213
	Negativo	30	44	74	
	Total	47	52	99	

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Avaliação dos testes em caramujos

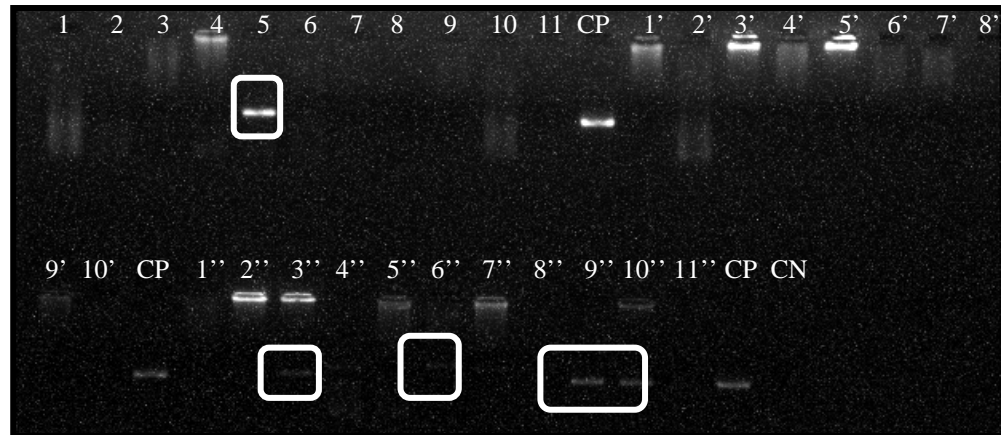
5.5.1 Mimetização da extração de DNA em caramujos

Ao mimetizar a extração de DNA de *S. mansoni* em caramujos, foi possível observar a presença de bandas apenas quando 1ng de DNA de *S. mansoni* foi adicionado e testado pelo sistema NPCR2.

5.5.2 Avaliação da NPCR2 em caramujos infectados

Nos caramujos com 5 dias de infecção, observou-se bandas positivas nos lotes: 1, 8 e 9. (Figura 13). Já para os caramujos com 21 dias de infecção, foi possível observar amplificação nos lotes: 1, 3, 4, 6, 7, 9 e 10 (Figura 14).

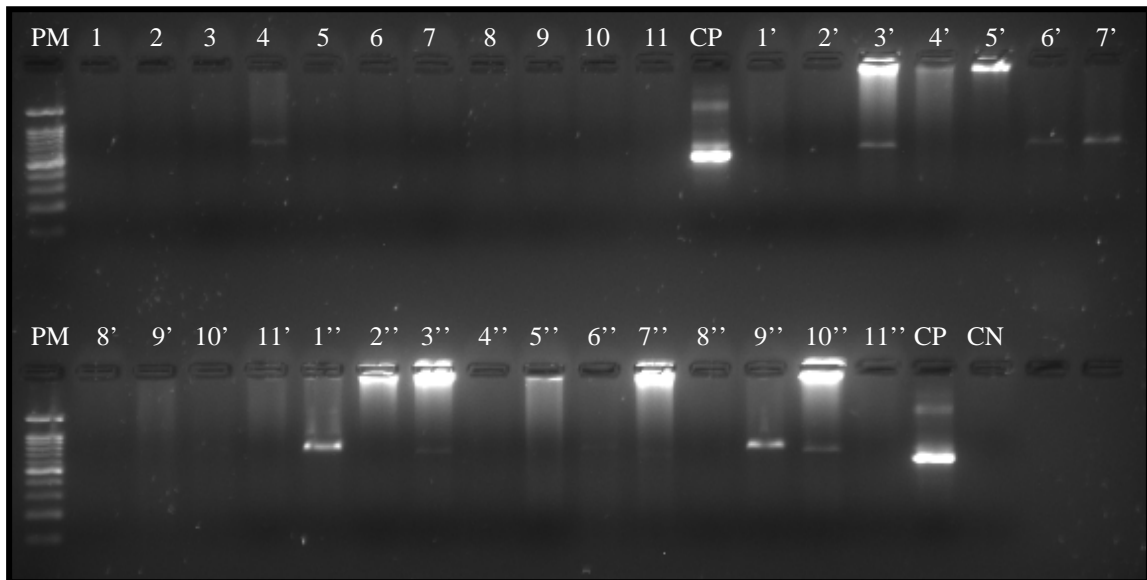
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da NPCR2 aplicada aos lotes de caramujos com 5 dias de infecção.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: 1 a 11 – diluição de 1:10 dos lotes de caramujos; 1' a 11' – diluição de 1:100 dos lotes de caramujo; 1'' a 11'' – diluição de 1:1000 dos caramujos; CP – Controle Positivo (1ng de DNA de *S. mansoni*); CN – Controle Negativo

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o resultado da NPCR2 aplicada aos lotes de caramujos com 21 dias de infecção.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: PM - Peso Molecular (100 pb Ladder); 1 a 11 – diluição de 1:10 dos lotes de caramujos; 1' a 11' – diluição de 1:100 dos lotes de caramujo; 1'' a 11'' – diluição de 1:1000 dos caramujos; CP – Controle Positivo (1ng de DNA de *S. mansoni*); CN – Controle Negativo

No quadro 9, é possível ver os resultados obtido para a NPCR2 aplicada nos caramujos com 5 e 21 dias de infecção.

Quadro 9 – Resultados da NPCR2 em pools de caramujos com 5 e 21 dias após a infecção experimental

Lote	Pools	5 dias pós infecção	21 dias pós infecção
1º lote	1 positivo + 49 negativos	Positivo	Positivo
2º lote	2 positivo + 48 negativos	Negativo	Negativo
3º lote	3 positivo + 47 negativos	Negativo	Positivo
4º lote	4 positivo + 46 negativos	Negativo	Positivo
5º lote	5 positivo + 45 negativos	Negativo	Negativo
6º lote	6 positivo + 44 negativos	Negativo	Positivo
7º lote	7 positivo + 43 negativos	Negativo	Positivo
8º lote	8 positivos + 42 negativos	Positivo	Negativo
9º lote	9 positivos + 41 negativos	Positivo	Positivo
10º lote	10 positivos + 40 negativos	Negativo	Positivo
11º lote	50 negativos	Negativo	Negativo

Fonte: Elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO

Essa tese avaliou sistemas de PCRs convencionais e Nested, em relação as suas sensibilidades e especificidades, com a finalidade de avaliar seu desempenho frente a amostras biológicas humanas (sangue, urina e LCR) e em caramujos.

Em relação à especificidade dos primers frente ao DNA de cercaria de ave observou-se uma distinção entre espécies apenas na NPCR2, utilizando ou não a técnica de RFLP com as enzimas *HhaI/HaeIII* separadamente. Podemos observar que, todos os *primers* utilizados neste trabalho foram desenhados pelo mesmo grupo de pesquisa (ABATH et al., 2002; MELO et al., 2006) e, na época em que foram desenhados, a informação sobre o genoma de *S. mansoni* e de outros organismos pertinentes ao estudo ainda não era completo, e possuía várias lacunas. Berriman et al. (2009), publicaram o genoma completo de *Schistosoma* e, posteriormente, com o advento de novas tecnologias como o RNA-seq, os dados acerca deste genoma foram atualizados e melhorados (PROTASIO et al., 2012). Talvez por isso, ao sequenciar os produtos de PCR obtidos pela NPCR2, obtivemos 97% de identidade deste produto com o DNA de outros organismos além de *S. mansoni*. Apesar disso, a importância dos nossos resultados está ligada ao fato da possibilidade de identificar do DNA de outro trematódeo e diferenciá-lo de *S. mansoni* sem a necessidade de sequenciar a amostra, fato que torna o diagnóstico mais rápido e de baixo custo.

Pontes et al. (2002) demonstraram que é possível amplificar o DNA de *S. mansoni* em amostras de fezes e soro humanos, quebrando o paradigma da utilização apenas das fezes para se diagnosticar a doença pelo método convencional. O diagnóstico do parasita em fluidos biológicos pode ser explicado devido à liberação de fragmentos de DNA a partir de células do verme adulto, ovos, metabólitos, excrementos e/ou restos celulares do parasita nestes meios (KATO-HAYASHI et al., 2015). Para Wong et al (2014), a detecção deste DNA é provavelmente mais sensível em helmintos intravasculares, como o *Schistosoma*, devido à constante liberação de células do parasito na corrente sanguínea, e estaria distribuído homogeneamente por todo o sangue do paciente, diferentemente do observado no método diagnóstico convencional da doença (WICHMANN et al., 2009).

A descoberta deste DNA livre-circulante abriu espaço para a utilização de fluidos biológicos que podem ser coletados de forma prática, não invasiva e barata (KATO-HAYASHI et al., 2015; SHIFF, 2015; SILVA et al., 2014), e que não dependam do ciclo circadiano (SHIFF, 2015), como a urina ou saliva. Consequentemente, a escolha desses

fluidos faz com que não haja a necessidade de profissionais treinados para coleta, resultando, inclusive, numa maior cooperação dos pacientes e na redução do risco de contaminação para os coletadores e examinadores da amostra (KATO-HAYASHI et al., 2015; SHIFF, 2015). Para Kato-Hayashi et al. (2015), a presença de DNA em diferentes fluidos do hospedeiro vertebrado pode ser indicativa de uma infecção ativa.

A NPCR1 foi otimizada e aplicada em DNA extraído de LCR obtido de pacientes com e sem neuroesquistossomose, demonstrando ser uma ótima ferramenta para diagnosticar esta forma clínica da doença. Além do trabalho publicado com estes resultados (BRUSCKY et al., 2016), apenas o trabalho de Harter et al (2014) relata o uso de uma qPCR para diagnosticar a neuroesquistossomose em LCR e soro de um paciente diagnosticado com esquistossomose através da biópsia retal. Os achados desses autores corroboram com o nosso estudo e demonstram que a PCR pode ser utilizada como técnica auxiliar no diagnóstico diferencial para esta forma clínica da doença. Contudo, é ideal que mais amostras sejam estudadas com o intuito de validar a PCR para este tipo de amostra.

Em relação à carga parasitária, encontramos uma prevalência de 86,9% dos indivíduos com uma carga parasitária leve, corroborando com o relatado por Gomes et al. (2016) em um inquérito realizado no ano de 2011 em Jaboatão dos Guararapes/PE, uma das localidades estudadas no nosso trabalho.

Até o momento, este é o primeiro trabalho que relata a avaliação da técnica de PCR em DNA extraído a partir de sangue total de indivíduos com ou sem infecção por *S. mansoni*, com uma sensibilidade de 25,3%. Ao compararmos este resultado com aqueles relatados por outros autores para amostras de soro, observa-se uma maior sensibilidade do que a encontrada por Ferrer et al (2015), o qual obteve uma sensibilidade de 2,32%. Outros autores também avaliaram o uso da PCR simples (CARVALHO et al., 2012; PONTES; DIAS; RABELLO, 2002; SADEK et al., 2008; WICHMANN et al., 2009) e da qPCR (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014; WICHMANN et al., 2013) em amostras de soro obtido de humanos sabidamente positivos, com sensibilidades variando entre 97,2-100% para a PCR simples e 20-95% para a qPCR. Haggag e Abdullah (2011) também avaliam este tipo de amostra, porém apesar de coletar o soro de 200 pacientes e encontrar relatar resultados positivos, os mesmos não relatam a sensibilidade da técnica, tornando impossível uma comparação de resultados.

Quando testado em urina, o sistema de NPCR2 apresentou uma sensibilidade de 47,5%. Outros 4 estudos publicados também obtiveram resultados positivos, demonstrando a plausibilidade da PCR método neste tipo de amostra. Sandoval et al. (2006) foram os primeiros autores a relatar o uso de urina como amostra, obtendo sensibilidades de até 100%,

contudo com amplificação inespecífica para *S. haematobium*. Segundo Gomes (2008), alguns dos *primers* estudados podem ser utilizados sem problemas no Brasil, mas não em locais onde haja a co-existência de outras espécies de *Schistosoma*, relatando amplificação inespecífica com o DNA de *S. haematobium*.

Os outros três trabalhos publicados que descrevem a aplicação da PCR em urina, utilizaram o mesmo par de *primers* desenvolvidos por Pontes et al. (2002), com sensibilidades entre 99-100% e especificidade de 91,2-100% (ENK et al., 2012; LODH et al., 2013; 2014). Contudo, vale salientar que estes *primers* foram originalmente utilizados por Hamburger et al (1991), e o mesmo relata amplificação de pequenas quantidades (5ng e 1ng) de DNA de *S. haematobium*, ou seja, caso estes *primers* estejam sendo utilizados em áreas onde há *S. mansoni* e *S. haematobium* co-existam, e a possibilidade de o indivíduo estar infectado com este parasita não seja excluída, pode-se ter uma superestimação da sensibilidade.

Uma possível explicação para os resultados negativos pela PCR, tanto em sangue quanto em urina, pode estar relacionada à etapa de extração de DNA, considerada crítica para o sucesso de uma PCR (BERGALLO et al., 2006) e que é tida como uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares em amostras biológicas.

Esta inibição é devida, principalmente, à presença de substâncias inibidoras nas amostras, as quais dificultam ou impossibilitam a amplificação do DNA alvo (RADSTRÖM et al., 2004), como por exemplo o grupo heme da hemoglobina que, por possuir íon Fe^{++} , irá competir com os íons de Mg^{++} da reação. Além disso, alguns inibidores são provenientes do processo de coleta ou extração do material biológico como o fenol e o clorofórmio (inibindo a ação enzimática), a proteinase-K (degradando a enzima *Taq* DNA polimerase), o EDTA e a heparina (quelantes dos íons magnésio) (SAMBROOK et al., 1989). Para a urina, um dos principais inibidores de PCR é a uréia quando presente em concentrações acima de 20 mM, assim como o nitrito (BERGALLO et al., 2006).

Avaliando o resultado por carga parasitária, temos a melhor sensibilidade obtida ao utilizar as amostras de urina, com 80% de positividade para indivíduos com alta carga parasitária (4 de 5 amostras), seguido da média (50%) e baixa (45,35%) cargas, o que era esperado já que quanto maior a carga parasitária, maior deve ser a quantidade de DNA livre-circulante no hospedeiro. Meurs et al. (2015) avaliaram uma Multiplex PCR em diferentes cargas parasitárias e encontraram sensibilidades variando entre 79% para amostras provenientes de pacientes com baixa carga parasitária e 100% para amostras com uma alta

carga. Seria ideal um número maior de amostras para as cargas parasitárias média e alta, para observar a fidedignidade do nosso teste para estas cargas parasitárias.

Comparando-se a performance da NPCR2 em sangue e urina, observamos uma concordância fraca entre as amostras. Uma explicação pode vir do fato da quantidade de amostra utilizada para os dois tipos de extração utilizados no trabalho. Para a amostra de sangue, utilizou-se um kit comercial de extração, o qual permite a extração de apenas 200 µL de amostra, enquanto que a extração pelo método de fenol-clorofórmio permite trabalhar com volumes bem maiores. Sarhan et al. (2015) compararam e avaliaram três métodos de extração de DNA (Salting out/resina, fenol-clorofórmio e kit comercial de extração), obtendo melhores resultados ao utilizar o método de fenol clorofórmio para extrair DNA de urinas provenientes de pacientes sabidamente positivos. Bergallo et al. (2006) demonstraram também que o método de fenol-clorofórmio foi o mais eficiente quando comparado com outros utilizados para extrair DNA de urina.

Obtivemos uma especificidade de 76,2% (16/21) para a NPCR2, independente da amostra utilizada, e apenas um indivíduo não infectado apresentou resultado positivo concomitantemente para as duas amostras. Como descrito anteriormente, a técnica convencional de diagnóstico possui uma baixa sensibilidade, tornando possível um diagnóstico de indivíduos falso-negativos.

Diversos trabalhos já foram publicados em relação à detecção do parasito em moluscos (CALDEIRA et al., 2004; JANNOTTI-PASSOS et al., 1997; 2006; HAMBURGER et al., 1998a; HANELT et al., 1997a; MELO et al., 2006a) e monitoramento de cercárias em coleções de água (HAMBURGER et al., 1998b).

Ao mimetizar a extração de DNA de *S. mansoni*, observamos uma positividade apenas no lote com adição de 1ng de DNA foi adicionado, diferentemente do observado por Gomes (2008), a qual obteve amplificação através da NPCR1 ao adicionar 0,4ng de DNA em lotes contendo 50 caramujos.

Nossos resultados demonstraram que é possível detectar o DNA de *S. mansoni* em lotes de 50 caramujos, mesmo quando se tem apenas um caramujo infectado há pelo menos 5 dias. Este fato levanta a importância do uso da PCR para diagnosticar moluscos infectados, pois a técnica permite a análise de vários caramujos de uma só vez, ao agrupá-los em lotes, em vez de analisa-los individualmente para liberação de cercarias, como proposto por Hamburger (2004). Segundo Melo et al (2006), este resultado demonstra que a NPCR é capaz de diagnosticar infecções pré-patentes em moluscos, o que não é possível pela técnica de exposição à luz. Leal (2010) aplicaram a PCR em moluscos expostos a diferentes quantidades

de miracídios de *S. mansoni* e em diferentes etapas do período pré-patente, e conseguiram amplificar o DNA do parasita em 80% das amostras, independentemente da quantidade de miracídios e do período de exposição dos caramujos. Semelhantemente, Gomes (2008) obteve uma positividade de 93,75% para a NPCR em caramujos coletados no campo, em comparação com os 37,5% observados através da técnica de exposição à luz, e relata que a análise de moluscos em lotes torna a técnica mais rápida e custo-efetiva, por aumentar a amostragem analisada. Porém, os resultados obtidos por Gomes (2008) nos levam ao questionamento já levantado em relação à amplificação de outros trematódeos de ave.

É importante ressaltar a importância da NPCR em oferecer um diagnóstico real de infecção nos hospedeiros invertebrados, visto as dificuldades diagnósticas observadas pela técnica tradicional. Além disso, em Pernambuco, diversos autores relatam o aumento da distribuição geográfica destes moluscos para áreas litorâneas (BARBOSA et al., 2014; 2015a; 2015b), e o uso desta técnica pode vir a ser útil na identificação de sítios de transmissão da doença nessas localidades.

7 CONCLUSÕES

- a) Observou-se que dentre as NPCRs estudadas, a NPCR1 pode ser utilizada como uma potente ferramenta para o diagnóstico da forma neuroesquistossomótica da doença.
- b) Para as amostras biológicas humanas, observou-se que a urina pode ser utilizada para auxiliar o diagnóstico de *S. mansoni* em humanos. Contudo recomenda-se que um número maior de amostras seja utilizado para validar a NPCR2 neste tipo de amostra, bem como para as amostras de sangue.
- c) Em relação aos caramujos, observou-se que a NPCR2 pode ser uma ferramenta potencial e custo-efetiva para o diagnóstico de *S. mansoni*, principalmente em moluscos obtidos no campo, permitindo a avaliação de áreas de transmissão e a distinção de moluscos infectados com outros trematódeos através da NPCR-RFLP.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques.**, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.
- ABATH, F.G.C. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 145-148, 2006.
- ABBASI, I. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 83, p.427–32, 2010. Disponível em: < <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/83/2/427.pdf?expires=1509387755&id=id&acname=guest&checksum=98DD45CA7A5C8A9272D60466DDCE49A7> >. Acesso em 17 Abr 2016.
- ABDEL-HAFEEZ, E.H. et al. Polymerase chain reaction: a better method for diagnosing chronic *Schistosoma mansoni* infections. **Trop. Med. Health.**, Nagasaki, v.43, p.205–209, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689611/pdf/tmh-43-4-205.pdf> >. Acesso em 15 Jun. 2016.
- ALLAM, A.F. et al. 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.**, Oxford, v. 14, p. 316–21, 2009.
- BARBOSA, C.S. et al. Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil. **Rev. Pan-Amaz. Saude.**, Ananindeua, v. 6, n. 3, p. 51-58, set. 2015a.
- BARBOSA, C.S. et al. First report of schistosomiasis on Serrambi beach, Ipojuca, State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 48, n. 6, p. 780-782, Dec. 2015b.

BARBOSA, C.S. et al. Epidemiologia da esquistossomose no litoral de Pernambuco. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v. 43, p.436-445, 2014.

BARBOSA, F.S. et al. Dynamics of snail populations of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* under semi-natural conditions. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 157-167, 1992. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/csp/v8n2/v8n2a07.pdf>>. Acesso em 29 Jan 2014.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 46, p. 1897–1900, June, 2008.

BERGALLO M. et al. Evaluation of six methods of extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. **New Microbiol.**, Pavia, v. 29, p. 111–119, 2006.

BERHE, N et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, Basel, v. 92, p. 205-212, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X04001780?via%3Dihub>>. Acesso em 20 Jan 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní**: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRUSCKY, I.S. et al. Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method. **J. Neurol. Sci.**, Amsterdam, v. 366, p. 87–90, 2016. Disponível em: < [http://www.jns-journal.com/article/S0022-510X\(16\)30242-8/fulltext](http://www.jns-journal.com/article/S0022-510X(16)30242-8/fulltext)>. Acesso em: 10 Ago 2016.

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CARVALHO, O.S. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails. **Acta Trop.**, v. 111, n. 1, p. 1-6, 2009. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X09000369>>. Acesso em: 10 Set 2014.

CALDEIRA, R. L. et al. Diagnostic of Biomphalaria snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 499-502, nov. 2004.

CARNEIRO, T.R. et al. A conventional polymerase chain reactionbased method for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low-endemicity area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 108, p.1037–1044, 2013.

CARVALHO, O. A. M. Mansonic neuroschistosomiasis. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v. 71, n. 9B, p. 714-716, set. 2013.

CARVALHO, G.C.D. et al. Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 107, p.899–902, 2012.

CAVALCANTI, M. G. et al. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 75-82, 2013. Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(12\)00196-1](http://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(12)00196-1)>. Acesso em: 13 Fev 2015

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos).

Schistosomiasis endemic area. Disponível em:

<http://wwwnc.cdc.gov/travel/content/yellowbook/2014/map_3-12.png>. Acesso em: 15 nov. 2013.

CHEN, J-H et al. [Development of a PCR assay for detecting *Schistosoma japonicum*-infected *Oncomelania hupensis*]. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.**, Shanghai v. 24, p.204–207, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094624>>. Acesso em 21 Nov 2013.

- COLLEY, D.G. et al., Human schistosomiasis. **Lancet**, London, v. 383, p. 2253–2264, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4672382/pdf/nihms-740522.pdf>>. Acesso em 30 Mar 2015.
- DOMINGUES, A.L.C. Diagnóstico por Imagem. In: Carvalho et al. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose**: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008.
- ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSEELS, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 54, p. 319-324, 1996. Disponível em: < <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1996.54.319>>. Acesso em: 15 Abr 2014
- ENK, M.J. et al. 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**, San Francisco, v.7, 2012. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038947>>. Acesso em: 15 Jun 2013.
- ENK, M. J.; SILVA, G. O.; RODRIGUES, N. B. A salting out and resin procedure for extracting *Schistosoma mansoni* DNA from human urine samples. **BMC Res. Notes**, London, v. 3, p. 1151-1154, 2010. Disponível em: <<http://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-3-115>>. Acesso em: 15 Jun 2013.
- ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 252, p. 1643-1651, 1991.
- ESPIRITO-SANTO, M.C.C. et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. **BMC Infect. Dis.**, London, v.14, p.558, 2014. Disponível em: < <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-014-0558-4>>. Acesso em 16 Jun 2015.
- ESPIRITO-SANTO, M.C.C. et al. Two sequential PCR amplifications for detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples with low parasite load. **Rev. Inst. Med. Trop. S.**

Paulo, São Paulo, v. 54, n. 5, 2012. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652012000500002. Acesso em: 21 Fev 2013.

FERNANDEZ-SOTO, P. et al. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 9, 2014. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003126>>. Acesso em: 15 Mai 2015.

FERNÁNDEZ-SOTO, P. et al. Long-Term Frozen Storage of Urine Samples: A Trouble to Get PCR Results in *Schistosoma* Spp. DNA Detection?. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 8, n.4, 2013. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061703>>. Acesso em: 10 Mar 2014.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. **Acta Trop.**, Basel, v. 108, n. 2-3, p. 87-97, 2008. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08000909?via%3Dihub>>.

Acesso em 03 Fev 2015.

FERRER, E. et al. Polymerase chain reaction for the amplification of the 121-bp repetitive sequence of *Schistosoma mansoni*: a highly sensitive potential diagnostic tool for areas of low endemicity. **J. Helminthol.**, London, v. 89, n.6, p. 769-73, Nov 2015.

GOMES, A.C.L. et al. Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 25, n.2, p.243-250, abr./jun., 2016.

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

GOMES, L.I. et al. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 4, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000664>>. Acesso em: 10 Mar 2014.

GOMES, L.I. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 1194–1196, 2009.

GOMES, A. L. V. **Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão.** 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

GRAY, D.J. et al. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ**, London, v. 342: 2011. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/342/bmj.d2651.long>>. Acesso em: 05 Dez 2014.

GRUNENWALD, H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. **PCR Protocols**. 2ed., New York : Humana Press, 2003, p. 3-6.

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

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, London, v. 368: p. 1106–1118, 2006. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)69440-3/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)69440-3/fulltext)>. Acesso em 12 Ago 2014.

HAGGAG, S.H.; ABDULLAH, S.M. Molecular diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in human serum and feces by using polymerase chain reaction. **Life Sci. J.**, [s.l.], v. 8, p. 398-404, 2011.

HAMBURGER, J. et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification suitable for molecular monitoring of schistosome-infected snails in field laboratories. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 88, n. 2, p.344-51, Fev. 2013. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/88/2/344.pdf?expires=1509387846&id=id&accname=guest&checksum=8CDAC8D66890732DFA71350A735F40AC>>. Acesso em 25 Jun 2014.

HAMBURGER, J. et al. Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma Haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snails infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, 71, n. 6, p. 765-773, Nov. 2004. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/71/6/0700765.pdf?expires=1509387934&id=id&accname=guest&checksum=64B0941F1ABB95A5369156FB01381018>>. Acesso em: 25 Jun 2014.

HAMBURGER, J. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 65, p. 907-911, 2001. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/65/6/11791997.pdf?expires=1509388002&id=id&accname=guest&checksum=BA406B7F14892EC03F5B3866BB1234CA>>. Acesso em: 25 Jun 2014

HAMBURGER, J. et al. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 468-473, Set. 1998a. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1998.59.468>>. Acesso em: 25 Jun 2014

HAMBURGER, J. et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, p. 872-876, Dez. 1998b. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/59/6/9886192.pdf?expires=1509388122&id=id&accname=guest&checksum=0AAAC9927DD15CDA21500DA82A0E5C02>> Acesso em: 25 Jun 2014.

HAMBURGUER, J. et al. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species specific probe. **Mol Biochem Parasitol.**

Amsterdam, v. 44, p. 73–80, 1991. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016668519190222R?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 Jul 2015

HAMBURGER, J.; WEIL, M.; POLLACK, Y. Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in extracts of whole individual snails by dot hybridization. **Parasitol Res.**, Berlin, v. 74, p.:97–

100, 1987. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3438296>>. Acesso em: 25 Abr 2014.

HANELT, B. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. **J.**

Parasitol., Lawrence, v. 83, n. 3, p. 387-394, Jun. 1997. Disponível em: <

<https://www.jstor.org/stable/3284399>>. Acesso em 13 Jun 2015

HÄRTER, G. et al. Diagnosis of neuroschistosomiasis by antibody specificity index and semi-quantitative real-time PCR from cerebrospinal fluid and serum. **J. Med. Microbiol.**,

Edinburgh v. 63, p. 309–312, 2014. Disponível em: <

http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/63/2/309_jmm066142.pdf?expires=1509386875&id=id&accname=guest&checksum=38B3C9FCBB48D4D4C6593889C21E52A2>. Acesso em 22 Jan 2015

HE, P. et al. Nucleic acid detection in the diagnosis and prevention of schistosomiasis. **Infect.**

Dis. Poverty, London, v. 5, n.25, 2016. Disponível em: <

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4812660/pdf/40249_2016_Article_116.pdf>. Acesso em: 25 Ago 2016.

HILHORST, M. et al. DNA extraction from long-term stored urine. **BMC Nephrol.**, London,

v. 14, p.238, 2013. Disponível em: <

<https://bmcnephrol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2369-14-238>>. Acesso em: 10 Mar 2014.

HERTEL, J. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR. **Acta Trop.**, Basel, v. 91, p.43-46, 2004. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X04000361>>. Acesso em: 28 Set 2015.

JANNOTTI-PASSOS, L. K. et al. Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae). **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 92, p. 401 -403, Abr. 2006. Disponível em: < http://www.bioone.org/doi/10.1645/GE-593R1.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&>. Acesso em: 24 Out 2015.

JANNOTTI-PASSOS, L.; SOUZA, C. P. Susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* to *Schistosoma mansoni* infection detected by low stringency polymerase chain reaction. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 291-294, Out. 2000. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v42n5/a10v42n5.pdf>>. Acesso em: 25 Fev 2014.

JANNOTTI-PASSOS, L.K. et al. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infected in *Biomphalaria glabrata* snails. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 83, p.395–399, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194818>>. Acesso em: 25 Abr 2016.

KATO-HAYASHI, N. et al. Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines. **Acta Trop.**, Basel, v.141, p.178–183, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X14001685>>. Acesso em: 09 Abr 2016.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis *mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, São Paulo, v. 14, p. 397-400, 1972. Disponível em: < <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/revista/vol14/397-400.pdf>>. Acesso em: 25 Jan 2014

LAMBERTON, P.H.L. et al. Sensitivity and Specificity of Multiple Kato-Katz Thick Smears and a Circulating Cathodic Antigen Test for *Schistosoma mansoni* Diagnosis Pre- and Post-repeated-Praziquantel Treatment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n.9, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003139>>. Acesso em: 15 Set 2015.

LEAL, S.V. **Aplicação da técnica de “Nested pcr” durante o período pré-patente para identificação de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata***. 2010. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Médica). Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

LODH, N. et al. Detection of parasite-specific DNA in urine sediment obtained by filtration differentiates between single and mixed infections of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* from endemic areas in Ghana. **PLoS ONE**, San Francisco, v.9, n.3, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091144>>. Acesso em: 15 Set 2015.

LODH, N. et al.. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infection from filtered urine in Zambia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 89, p.46-50, 2013. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/89/1/46.pdf?expires=1509387701&id=id&accname=guest&checksum=7D5B78778668219B04D9F62122FC8D52>>. Acesso em 25 Jan 2015.

MALEK, E.A.; ROUQUAYROL, M.Z. Experimental infection with *Schistosoma mansoni* of *Biomphalaria straminea* from different parts of the Northeast of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 28, p. 160-165, 1986. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46651986000300004&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 15 Jan 2015.

MANZELLA, A. et al. Schistosomiasis of the liver. **Abdom. Imaging**, New York, v. 33, n. 2, p. 144-150, 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00261-007-9329-7>>. Acesso 10 Jan 2015.

MATAS, S. L. A. Neuroesquistossomose. **Rev. Neurociênc.**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 27-31, 2001.

MATTOS, A.A.; DANTAS-CORREA, E.B. **Tratado de Hepatologia**. 1. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MELO, F.L et al. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 100, p.1049-1055, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920306000381>>. Acesso em 25 Jan 2014

MEURS, L. et al. Is PCR the Next Reference Standard for the Diagnosis of *Schistosoma* in Stool? A Comparison with Microscopy in Senegal and Kenya. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003959>>. Acesso em: 07 Jan 2016.

MONTRESOR A et al. **Guidelines for the evaluation of soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis at community level: a guide for managers of control programmes**. Geneva: WHO, 1998.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

OLIVEIRA, L.M. et al. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 68, p.416-421, 2010. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732-8893\(10\)00291-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732-8893(10)00291-9)>. Acesso em: 25 Jan 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elimination of schistosomiasis in low transmission areas**: Salvador, Bahia. Report of the WHO Informal Consultation. Geneva: WHO, 2009.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002. Disponível em: <
<https://www.nature.com/nri/journal/v2/n7/full/nri843.html>>. Acesso em: 03 Jul 2014.

PEELING, R.W.; NWAKA, S. Drugs and diagnostic innovations to improve global health. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 25, p.693-705, 2011.

PERNAMBUCO. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR – 2011-2014** / Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde – Recife : Secretaria Estadual de Saúde, 2013.

PONTES, L.A. et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 652-656, 2003. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/68/6/0680652.pdf?expires=1509388758&id=id&accname=guest&checksum=26F0116BD86926FC965EA7DA65CBF292>>. Acesso em 09 Jan 2015.

PONTES, L.A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 66, n. 2, p. 157-162, 2002. Disponível em: <
<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/66/2/12135287.pdf?expires=1509388802&id=id&accname=guest&checksum=CFBEFB9387CE2A3EB84FAAEC53240D6>>. Acesso em: 16 Fev 2014.

PORDEUS, L.C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol. serv. saúde**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

PRATA, A.R.; COURA JR, R. Fases e Formas Clínicas da Esquistossomose Mansonii. In: CARVALHO, O.S; COELHO, P.M.Z, LENZI, H.L. (Ed.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 1, pp. 739-788, 2008.

PROTASIO, A.V. et al. A Systematically Improved High Quality Genome and Transcriptome of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v.6, n.1, 2012; Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001455>>. Acesso em: 07 Jan 2016.

RÄDSTROM, P. et al. Pre-PCR Processing: strategies to generate PCR-compatible samples. **Mol. biotechnol.**, Totowa, v. 26, n. 2, p. 133-146, Feb. 2004. Disponível em: <

<https://link.springer.com/article/10.1385%2FMB%3A26%3A2%3A133>>. Acesso em: 29 Jul 2015

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SADEK, M.S.M. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in Human Blood as a Diagnostic Method for Schistosomiasis. **J Egypt. Parasitol. United**, Cairo, v. 1, p.31 – 36, 2008. Disponível em: <

https://www.researchgate.net/publication/281280417_Detection_of_Schistosoma_mansoni_DNA_in_Human_Blood_as_a_Diagnostic_Method_for_Schistosomiasis>. Acesso em: 20 Jun 2014.

SADY, H. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* by Real-Time PCR with High Resolution Melting Analysis. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 16, p. 16085-16103, 2015. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4519940/>>. Acesso em: 25 Feb 2016

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDOVAL, N.; et al. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. **Parasitology**,

London, v. 133, p.581-587, 2006. Disponível em: <
<https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/new-pcrbased-approach-for-the-specific-amplification-of-dna-from-different-schistosoma-species-applicable-to-human-urine-samples/2091DA066603EBF39AC6954A8A5A5C54>>. Acesso em: 24 Jun 2015.

SARHAN, R. M. et al. Evaluation of Three Extraction Methods for Molecular Detection of *Schistosoma Mansoni* Infection in Human Urine and Serum Samples. **J. Parasit. Dis.**, Lucknow, v. 39, n.3, p. 499–507, 2015. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554594/>>. Acesso em: 24 Jun 2016

SCHOLTE, R.G.C. et al. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, Napoli, v. 6, n. 3, p. S95-S101, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23032289>>. Acesso em 01 Mar 2015.

SCHUNK, M. et al. Use of Occult Blood Detection Cards for Real-Time PCR-Based Diagnosis of *Schistosoma* Mansoni Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 9, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137730>>. Acesso em: 07 Jan 2016.

SHIFF, C. Accurate diagnostics for schistosomiasis: a new role for PCR?. **Rep. Parasitol.**, London, v. 4, p. 23–29, 2015. Disponível em: < <https://www.dovepress.com/accurate-diagnostics-for-schistosomiasis-a-new-role-for-pcr-peer-reviewed-article-RIP>>. Acesso em 24 Jun 2016

SILVA, M. A. L. et al. A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 47, n. 2, p. 193-197, Apr. 2014. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000200193>. Acesso em: 24 Jun 2015

SIQUEIRA, L.M.V. et al. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis *mansoni* in a low transmission area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, p. 209–214, 2015.

SOUZA, F.P.C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clin. Med.**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

VERWEIJ, J. J.; STENSVOLD, C. R. Molecular Testing for Clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v. 27, n. 2, p. 371– 418, April, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993103/>>. Acesso em 06 Fev 2015.

VITORINO, R.R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev. Bras. Clin. Med.**, São Paulo, v. 10, n.1, p.39-45, jan./fev, 2012.

WICHMANN, D. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 13, 2013. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-55>>. Acesso em: 07 Jan 2016.

WICHMANN, D. et al. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. 422, 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000422>>. Acesso em: 07 Jan 2016.

WONG, S.S.Y. et al. Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why?. **Exp. Biol. Med.**, Maywood, v. 239, p. 1443–1460, 2014. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1535370214523880?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&>. Acesso em 25 Jun 2015.

ZHAO, G.H.; et al. Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp. **Biotechnol. Adv.**, New York, v. 30, p.1381–1389, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000456>>. Acesso em: 10 Abr 2014.

APENDICE A – QUESTIONÁRIO ESQUISTOSSOMOSE - CASOS

QUESTIONÁRIO ESQUISTOSSOMOSE - CASOS						
DADOS DO INDIVÍDUO						
1. Registro _____	2. Data do Questionário ____/____/____					
3. Nome do Paciente _____						
4. Data de Nascimento ____/____/____	5. Sexo () Masculino () Feminino					
6. Endereço _____						
DADOS SOCIOECONÔMICOS						
7. Há quanto tempo mora nessa casa? _____	8. Onde morava antes? (Informar Bairro e cidade). _____					
9. Alguma vez na vida você teve contato com água suspeita de estar contaminada com <i>Schistosoma</i>? () Sim () Não						
10. Há quanto tempo você teve contato com água suspeita? _____						
11. Tipo de contato a. Banho de rio () b. Pescaria () c. Lavar roupas/pratos () d. Lazer () e. Outros: _____						
SINAIS E SINTOMAS						
12. Você tem dificuldade em defecar? () Sim () Não Quantas vezes ao dia? () 1 () 2 () Mais: _____	13. Já apresentou sangue nas fezes? () Sim () Não Último episódio: _____					
14. Já vomitou sangue? () Sim () Não Quantas vezes? _____ Último episódio: _____						
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO						
15. Coletou amostra? () Sim () Não	16. Data da coleta: ____/____/____	17. Amostras coletadas () Sangue () Urina				
18. Resultado Kato-katz (em ovos por grama de fezes) <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse; text-align: center; width: 100px; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 25px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 25px; height: 20px;"> </td> </tr> </table>					19. Já fez tratamento para esquistossomose? () Sim () Não Quando? _____	

Entrevistador: _____	Assinatura: _____
------------------------------------	---------------------------------

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ESQUISTOSSOMOSE – NÃO CASOS

QUESTIONÁRIO ESQUISTOSSOMOSE – NÃO CASOS		
DADOS DO INDIVÍDUO		
1. Registro _____	2. Data do Questionário ____/____/____	
3. Nome do Paciente _____		
4. Data de Nascimento ____/____/____	5. Sexo () Masculino () Feminino	
6. Endereço _____		
DADOS SOCIOECONÔMICOS		
7. Há quanto tempo mora nessa casa? _____	8. Onde morava antes? (Informar Bairro e cidade). _____	
9. Alguma vez na vida você teve contato com água suspeita de estar contaminada com <i>Schistosoma</i>? () Sim () Não		
10. Há quanto tempo você teve contato com água suspeita? _____		
11. Tipo de contato a. Banho de rio () b. Pescaria () c. Lavar roupas/pratos () d. Lazer () e. Outros: _____		
SINAIS E SINTOMAS		
12. Você tem dificuldade em defecar? () Sim () Não Quantas vezes ao dia? () 1 () 2 () Mais: _____	13. Já apresentou sangue nas fezes? () Sim () Não Último episódio: _____	
14. Já vomitou sangue? () Sim () Não Quantas vezes? _____ Último episódio: _____		
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO		
15. Coletou amostra? () Sim () Não	16. Data da coleta: ____/____/____	17. Amostras coletadas () Sangue () Urina
18. Resultado Kato-katz (em ovos por grama de fezes) □ □ □ □	19. Resultado teste imunológico () Positivo () Negativo	
20. Já fez tratamento para esquistossomose? () Sim () Não Quando? _____		

Entrevistador: _____	Assinatura: _____
--------------------------------	-----------------------------

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 18 ANOS)

Convidamos o menor _____, a participar da pesquisa “**Desenvolvimento e validação de um kit baseado em Nested-PCR em único tubo para o diagnóstico de esquistossomose em caramujos e em amostras de sangue e urina**” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), cujo objetivo é desenvolver e validar um novo método para um diagnóstico mais simples e rápido para a esquistossomose, resultando em um grande benefício para a população que mora em locais onde há muitos casos dessa doença.

Para este fim, solicitamos que seja realizado uma coleta de até 10 mL (5 colheres de sopa) de sangue coletado na veia e 30 - 50 mL (10 – 20 colheres de sopa) de urina para pesquisar substâncias liberadas (material genético, DNA) pelo micróbio da esquistossomose. Todo material utilizado na coleta é estéril (nunca utilizados e sem micróbio). Informamos que a coleta de urina não oferece nenhum risco e que o exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha, podendo, em alguns casos, ocorrer à formação de placas roxas (hematomas) que desaparecerão espontaneamente e sem nenhum tratamento. Caso o (a) menor seja portador (a) da esquistossomose, diagnosticado no exame de fezes pela equipe do SANAR, ele (a) será encaminhado a uma equipe médica especializada.

Os resultados obtidos poderão ser divulgados em trabalhos científicos e relatórios, mas garantimos que em nenhum momento haverá identificação do (a) menor nem de seus familiares. Em qualquer momento da pesquisa, o (a) menor e ou responsável tem a liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer problema para o seu acompanhamento clínico e tratamento, se for o caso. Também ficamos a disposição para esclarecimentos sobre o estudo quando o Sr. (a) achar necessário.

Solicitamos também que seja autorizada a guarda dos materiais coletados, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, o Sr. (a) será contatado para uma nova autorização.

Antes da assinatura desse termo, foram fornecidas informações necessárias para o melhor entendimento. Esse termo será assinado em duas vias, ficando uma com o Sr. (a) e outra arquivada com o responsável pelo projeto.

Recife, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do menor: _____

Assinatura do Membro da Pesquisa: _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dr. Fábio Melo, biólogo do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2662.

Dra. Maria Almerice Lopes da Silva, Farmacêutica, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

Leandro Batista Wanderley, Biólogo, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

**APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA
MAIORES DE 18 ANOS)**

Convidamos o Sr. (a) _____ para participar do projeto de pesquisa “**Desenvolvimento e validação de um kit baseado em Nested-PCR em único tubo para o diagnóstico de esquistossomose em caramujos e em amostras de sangue e urina**” que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), cujo objetivo é desenvolver e validar um novo método para um diagnóstico mais simples e rápido para a esquistossomose, resultando em um grande benefício para a população que mora em locais onde há muitos casos dessa doença.

Para este fim, solicitamos que seja realizado uma coleta de até 10 mL (5 colheres de sopa) de sangue coletado na veia e 30 - 50 mL (10 – 20 colheres de sopa) de urina para pesquisar substâncias liberadas (material genético, DNA) pelo micróbio da esquistossomose. Todo material utilizado na coleta é estéril (nunca utilizados e sem micróbio). Informamos que a coleta de urina não oferece nenhum risco e que o exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha, podendo, em alguns casos, ocorrer à formação de placas roxas (hematomas) que desaparecerão espontaneamente e sem nenhum tratamento. Caso o Sr. (a) seja portador (a) da esquistossomose, diagnosticado no exame de fezes pela equipe do SANAR, Sr. (a) será encaminhado a uma equipe médica especializada.

Os resultados obtidos poderão ser divulgados em trabalhos científicos e relatórios, mas garantimos que em nenhum momento haverá identificação do Sr. (a) nem de seus familiares. Em qualquer momento da pesquisa, Sr. (a) tem a liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer problema para o seu acompanhamento clínico e tratamento, se for o caso. Também ficamos a disposição para esclarecimentos sobre o estudo quando o Sr. (a) achar necessário.

Solicitamos também que seja autorizada a guarda dos materiais coletados, e caso esse material seja utilizado em futuras pesquisas, o Sr. (a) será contatado para uma nova autorização.

Antes da assinatura desse termo, foram fornecidas informações necessárias para o melhor entendimento. Esse termo será assinado em duas vias, ficando uma com o Sr. (a) e outra arquivada com o responsável pelo projeto.

Recife, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do Membro da Pesquisa: _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dr. Fábio Melo, biólogo do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2662.

Dra. Maria Almerice Lopes da Silva, Farmacêutica, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

Leandro Batista Wanderley, Biólogo, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, localizado - Av. Moraes Rego, s/n, no Campus da UFPE, CEP: 50670-420 Recife-PE, e pelo Fone: 0XX81 2101-2695.

APÊNDICE E - ARTIGO PUBLICADO

Journal of the Neurological Sciences 366 (2016) 87–90



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jns

Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method



Igor Silvestre Bruscky^a, Fábio Lopes de Melo^b, Zulma Maria de Medeiros^c, Flávia Falcão Albuquerque^d, Leandro Batista Wanderley^b, Carolina da Cunha-Correia^{e,*}

^a School of Medicine, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco state, Brazil

^b Aggeu Magalhães Research Center/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco state, Brazil

^c University of Pernambuco, Aggeu Magalhães Research Center/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco state, Brazil

^d Pernambuco Center for Neurological Diagnosis, Recife, Pernambuco state, Brazil

^e Oswaldo Cruz University Hospital, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco state, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2015

Received in revised form 26 April 2016

Accepted 27 April 2016

Available online 28 April 2016

Keywords:

Schistosomiasis

Schistosoma mansoni

Neurocysticercosis

Polymerase chain reaction

Myelitis

ABSTRACT

Introduction: Spinal cord schistosomiasis is a neglected, disabling neurological disease commonly identified in patients from northeast Brazil. The methods currently available for its diagnosis need improvement. PCR in feces and urine is a sensitive diagnostic tool for diagnosis of schistosomiasis, but its value in the cerebrospinal fluid (CSF) is still unknown.

Objective: The objective of this study was to detect *Schistosoma mansoni* DNA in CSF from patients with spinal cord schistosomiasis, using the nested PCR (NPCR) assay.

Methods: This was a cross-sectional study carried out from March 2013 to January 2014 at the Aggeu Magalhães Research Center/FIOCRUZ (Pernambuco state, Brazil). NPCR was used to detect *Schistosoma mansoni* DNA in CSF samples from 20 patients with spinal cord schistosomiasis and 30 controls.

Results: NPCR was positive in 16 patients with spinal cord schistosomiasis and none from the control group (sensitivity 80%; specificity 100%; positive predictive value 100%; negative predictive value 88.2%).

Conclusion: The NPCR technique is highly sensitive and specific for diagnosis of spinal cord schistosomiasis and can be an important diagnostic tool, particularly in cases with negative CSF serology.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by *Schistosoma* sp. It affects approximately 200 million people worldwide and a further 80 million are at risk [1]. Schistosomiasis remains a public health issue in South America [2].

People become infected during contact with infected water, when cercariae penetrate their skin. Spinal cord schistosomiasis is one of the most serious clinical manifestations of the disease and the most common neurological manifestation of infection by *Schistosoma mansoni* [3]. It is estimated that the central nervous system is involved in 4% of patients with schistosomiasis japonica, but their occurrence in other *Schistosoma* species is unknown [4].

The embolization of eggs from *Schistosoma mansoni* is the most important mechanism to reach the spinal cord. This spread probably occurs through Batson's venous plexus, a network of valveless that connects the portal venous system, deep iliac veins and inferior vena cavae with spinal cord veins [5].

This pathway is also mentioned as permissive for adult worms to migrate to enclosed sites such as the central nervous system, which is followed by in situ egg-laying or mass embolization of eggs. Given their size, the eggs of *Schistosoma mansoni* are generally retained in the lower spinal cord [5] and contain miracidia, which reach maturity in five days and survive for approximately three more weeks [6].

The persistence of *Schistosoma* in the body, induce an immune response to the eggs with granulomatous reaction, which leads to overproduction of collagen and causes a cellular reaction mediated by CD4+ T-helper cells [5].

Current diagnostic methods for schistosomiasis of the spinal cord have low sensitivity and specificity. Accurate diagnosis of this disease is important because early treatment can minimize sequelae [7,8]. Even the criteria of the Ministry of Health of Brazil or CDC, cannot support a definitive diagnosis for this disease [9].

Thus, better laboratory tools with the aim of achieving a more accurate diagnosis are needed. Polymerase chain reaction has been applied in the study of *Schistosoma mansoni* DNA on feces and urine [10], but its value in the cerebrospinal fluid (CSF), is still unknown.

The purpose of this study was to evaluate the use of NPCR in the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in the CSF of patients with spinal cord schistosomiasis.

* Corresponding author at: Rua Arndino Menezes, 310-Santa Annara, Recife, Pernambuco state, Brazil.

E-mail address: carolina.dac@ufpe.br (C. da Cunha-Correia).

2. Methods

This was a cross-sectional study involving 50 patients, 20 suffering from acute spinal cord schistosomiasis and 30 controls (with other causes of myelitis). Patients were recruited from March 2013 to January 2014 in the infirmary of the Neurology Department at the Restauração Hospital, Pernambuco state, Brazil, an endemic area for schistosomiasis.

Patients were defined as having spinal cord schistosomiasis according to the criteria of the Brazilian Ministry of Health, that is, exhibiting clinical manifestations of disease of the lower thoracic or lumbar spine, medullary cone and cauda equina (pain, motor impairment and sphincter disturbance) associated with evidence of spinal cord inflammation, confirmed by CSF and magnetic resonance imaging. Evidence of exposure to *Schistosoma* was confirmed by a positive immunologic test in serum or in the CSF, presence of eggs in stool or in rectal biopsy and exclusion of other causes of myelitis [9].

After diagnosis of acute spinal cord schistosomiasis this group was treated with praziquantel and followed after 3 months, obtaining better neurological outcome.

CSF samples (1 mL) from all patients and controls were collected by lumbar puncture. CSF analysis consisted of general and specific cell count, CSF glucose, CSF protein, protein electrophoresis and immunological determinations for schistosomiasis (ELISA), herpes, syphilis, cytomegalovirus, toxoplasmosis, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human immunodeficiency virus, varicella zoster, Cryptococcus and human cell lymphotropic virus. These samples were also analyzed using NPCR at the Aggeu Magalhães Research Center in RECIFE, Pernambuco state.

A *Schistosoma mansoni* strain was routinely maintained at the Laboratory of Schistosomiasis (Department of Parasitology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brazil) in outbred albino mice and in *Biomphalaria glabrata* snails. Mice were infected by subcutaneous injection of approximately 250 cercariae and snails were infected by overnight exposure to 10 miracidia/snail. Adult worms were obtained by liver perfusion.

Schistosoma DNA was purified using the illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GI Healthcare, UK) in according to the manufacturer's instructions.

The DNA in CSF samples from patients was extracted and purified which using the illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GI Healthcare, UK) in according to the manufacturer's instructions. Thus, it was quantified in a spectrophotometer and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The primers used were Sch611 (5'-GTTACGATCAGGACGAGTCT-3'), Uvre16 (5'-CCGGAGATCTAAGGGGATCA-3'), Sch617 (5'-GTGGTCGTGGGTGAGGAGTTC-3') and Schre19 (5'-CTAAAGGAGCACAGAGGAC-3'). These primers 11, 17 e 19 were specific for *S. mansoni*, whereas primers Uvre16 were based on a highly conserved region identified by alignment of sequences from a great number of different species [11].

Basically, the external (Sch611/Uvre16) and internal (Sch617/Schre19) PCRs were carried out in a final volume of 50 μL with 50 mM of KCl, 10 mM of Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM of MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 50 pmol of each primer and 25 U of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen®, USA).

The first stage of NPCR (with external primers) was performed initially at 92 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, the 30 cycles, each consisting of 92 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ for 60 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 60 s followed by a final extension of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 7 min. The second stage of NPCR (using internal primers) was performed using the same reaction mixture and cycling conditions as reported above for conventional PCR, except that the internal primers annealed at 56 $^{\circ}\text{C}$. Two microliters of the product of the first NPCR stage was used as template for the second NPCR stage.

To assess the detection limit of PCR, that is, to learn the lowest concentration of DNA primers capable of amplifying each kind of PCR (external, internal and nested) a dilution factor curve 10 was constructed from the purified genomic DNA of *Schistosoma mansoni*, in concentrations between 0.5 ng/ μL and 0.5 fg/ μL , using 2 μL of each concentration in the reaction.

Ten microliters of the PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis in a 2x by staining with ethidium bromide according to standard methodology [11]. DNA bands were visualized on a transilluminator ultraviolet light and photographed.

To confirm the amplified PCR products, the amplicons obtained from the NPCR reactions were purified (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, GI Healthcare, New York, USA) and sequenced using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (version 3.1) (Applied Biosystems) in an automated sequencer (ABI 3100 Genetic Analyzer). Sequences were determined in both directions (using the same primers individually as for the PCR) and the electropherograms verified by eye. Sequences obtained were compared with those available in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides (BLASTn). Confirming the specificity of the primers for the correct targets in the NPCR reactions, amplicons obtained with the primer set obtained high similarity.

The study was approved by the medical ethics committee of Hospital da Restauração (CAAE 14306/13.4.0000.5198). All the subjects agreed to participate and gave written informed consent.

3. Results

The detection limit obtained for external and internal PCR was 1 pg for both (Fig. 1A and B, respectively). Already NPCR was more sensitive, reaching a 1 fg detection limit (Fig. 1C).

There was no statistically significant intergroup age difference between the 50 patients studied. Group 1 consisted of 20 patients with

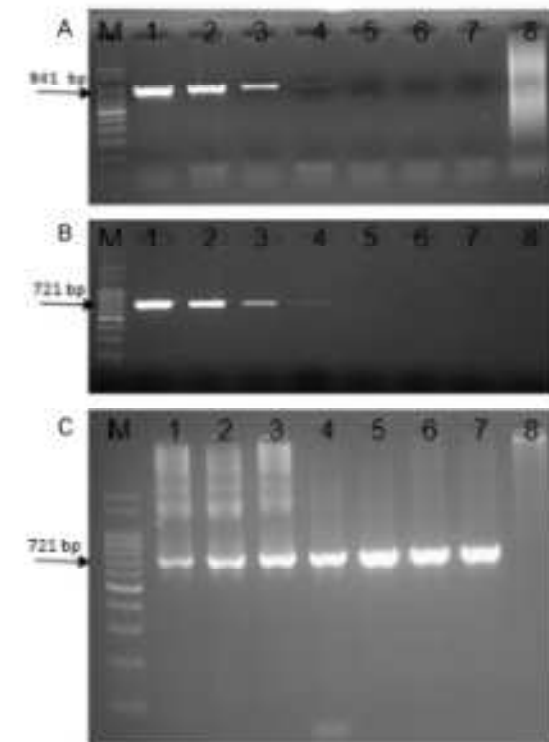


Fig. 1. Detection limit for PCRs. A: External PCR. Line M: molecular weight marker of 100 bp; 1–3: 10-fold dilution series, 1 pg–0.1 pg; 4: negative control; B: Internal PCR. Line M: molecular marker; 1–7: 10-fold dilution series, 1 pg–1 fg; 8: negative control; C: NPCR. Line M: molecular marker; 1–7: 10-fold dilution series, 1 ng–1 fg; 8: negative control.

spinal cord schistosomiasis, 12 (60%) of whom were female and 8 (40%) male, with an average age of 39.5 ± 15.1 years.

NPCR was positive in 16 cases but in none of the controls. 80% sensitivity (95% CI: 56.3–94.2); 100% specificity (95% CI: 88.4–100); 100% PPV (95% CI: 79.4–100); 80% NPV (95% CI: 72.5–97) and 92% accuracy. ELISA in CSF showed sensitivity of 50% (Table 1).

Of the 4 negative NPCR cases, 3 exhibited negative ELISA tests and were submitted to rectal biopsy to detect exposure to schistosomes and confirm the diagnosis.

In 7 patients with positive NPCR, ELISA in CSF was negative and the participants had to undergo rectal biopsy to confirm the diagnosis.

In Table 2 are the patients of the control group.

4. Discussion

Diagnosing schistosomiasis is more challenging in endemic areas where seroprevalence is high. Since Pernambuco state is an endemic area for *Schistosoma mansoni*, the detection of circulating antibodies was not emphasized in the present study.

Although diagnostic methods have been developed for schistosomiasis using antibodies against *Schistosoma* antigens, they exhibit low sensitivity and specificity, do not allow the discrimination of present and past infection and can be false-positive due to cross reactivity with other parasites [12,13]. As a result, new diagnostic tools were needed.

The introduction of PCR technology to amplify DNA revolutionized clinical medicine, but is not being routinely used in underdeveloped countries [14]. PCR is a highly sensitive specific technique particularly useful for detecting infectious agents [15].

Patients with spinal cord schistosomiasis usually excrete few eggs in stool, therefore the stool parasitological examination has high rate of false negative results. Some references in the literature refer the use of *Schistosoma mansoni* DNA analysis as a good diagnostic tool in feces, urine and blood, but with controversial results [16,17]. In serum samples a method based in cell-free parasite DNA, performed well, but with better results in the acute phase of schistosomiasis and for monitoring treatment parameters [18]. In feces, a single PCR survey showed a high statistical correlation with three parasitologic examinations (kappa value = 0.8) and also had higher sensitivity (97% versus 79%) [19].

The NPCR utilized in this study was designed for a small subset of ribosomal RNA (18S rDNA) as a target and it was previously used in the identification of infection in snails, and demonstrated a sensitivity of 93.8%, with results better than conventional PCR [20].

Table 1
Results of NPCR and ELISA in patients with spinal schistosomiasis.

Patient	Age	Sex	NPCR	ELISA	Rectal biopsy	Symptom duration (days)
1	30	F	P	P	NP	4
2	28	M	P	P	NP	3
3	27	F	P	N	E	5
4	31	M	P	N	E	5
5	26	F	P	P	NP	2
6	45	F	N	N	E	15
7	24	F	P	N	E	0
8	48	M	P	P	NP	2
9	27	F	P	N	E	30
10	18	F	P	N	E	3
11	31	F	P	N	E	4
12	42	M	N	N	E	14
13	32	M	P	P	NP	1
14	60	M	P	N	E	4
15	27	F	P	P	NP	4
16	25	F	P	P	NP	5
17	26	M	N	N	E	36
18	40	F	P	P	NP	1
19	32	M	N	P	NP	14
20	41	F	P	P	NP	2

F = female; M = male; P = positive; N = negative; NP = not performed; E = eggs.

Table 2
Control group characteristics (n = 30).

Control	Age	Sex	NPCR	Diagnosis
1	48	M	N	OMV myelitis
2	18	M	N	Tramacco myelitis
3	58	F	N	B12 deficiency myelopathy
4	25	M	N	OMV myelitis (HIV)
5	42	F	N	Multiple sclerosis
6	55	F	N	Neurosyphilis myelitis
7	38	F	N	B12 deficiency myelopathy
8	64	M	N	Spinal cord leukodystrophy
9	21	F	N	Multiple sclerosis
10	35	F	N	Neurosyphilis myelitis
11	40	F	N	HIV myelitis
12	51	F	N	Neurosyphilis myelitis
13	54	M	N	Tramacco myelitis
14	33	M	N	Lupus myelitis
15	26	F	N	Spinal cord myelitis
16	19	F	N	Multiple sclerosis
17	70	F	N	Spinal cord leukodystrophy
18	23	M	N	HIV myelitis
19	38	M	N	Paraneoplastic myelitis
20	60	F	N	HIV myelitis
21	75	M	N	Radiation myelitis
22	55	M	N	Decompression sickness myelopathy
23	68	M	N	B12 deficiency myelopathy
24	30	F	N	Intramedullary tumor
25	21	F	N	Tramacco myelitis
26	27	M	N	HIV myelitis
27	38	F	N	Spinal cord myelitis
28	42	M	N	Multiple sclerosis
29	33	M	N	Tramacco myelitis
30	19	M	N	Multiple sclerosis

F = female; M = male; N = negative; OMV = optic neuropathy; HIV = human immunodeficiency virus; HIV = human T-cell lymphotropic virus; HSV = herpes simplex virus.

When applied to analyze *Schistosoma mansoni* DNA in the CSF of patients with spinal cord schistosomiasis, NPCR proved to have high specificity (100%), sensitivity (80%), high positive predictive value (100%) and accuracy (92%) also agree with the promising utility of this method. On the other hand, the sensitivity of ELISA testing was only 50% in the CSF, producing delays in diagnosis and treatment, and increasing risk of neurological sequelae. Its high sensitivity and specificity makes NPCR a more attractive diagnostic alternative in terms of serology.

Few studies use this method in CSF, presenting comparisons with our results. Recently, a case report detected *Schistosoma* DNA in CSF using real time PCR. Although standardization of this procedure has not been described, the authors believe that it appear to be useful [21].

To date, the gold standard for diagnosis of spinal cord schistosomiasis is spinal cord biopsy, not performed due to high complication risks [8].

The use of NPCR to indicate *Schistosoma mansoni* exposure may avoid rectal biopsy and its possible complications, including gastrointestinal perforation, bleeding and infection.

One of the possible causes for negative NPCR in our four cases may be due to the fact that this group of patients arrived at the hospital after experiencing symptoms for fourteen days or more. This may have allowed collagen-rich tissue to form around the egg preventing the detection of *Schistosoma mansoni* DNA.

Because our sample have only 20 patients (<30 patients), the confidence intervals for sensitivity are large. Further studies with larger samples are necessary.

Our results represent a series of cases with a small sample, and the primers were based on a highly conserved region. They should be interpreted with caution, and further research is needed to validate this method as a diagnostic tool for spinal cord schistosomiasis.

5. Conclusion

The NPCR technique may be helpful for diagnosis of spinal cord schistosomiasis, particularly in cases with negative CSF serology.

Further studies, with larger samples, are needed for the method's validation and clinical use.

Conflicts of interest

None to declare.

References

- [1] A.G. Rios, D.P. McManus, J. Parson, R.J. Hutchinson, D.J. Goy, V.S. Li, Neurodegeneration, *J. Neurol.* 250 (2012) 22–32.
- [2] R. Druce-Timothy, A.M. Hickey, M.G. Reis, S.L. McEllen, S.S. Warner, Sources and distribution of surface water local contamination and prevalence of schistosomiasis in a rural village, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (10) (2014) e3106, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0310166>.
- [3] E.J. Grimes, D. Craig, W.R. Hamlin, J. Uttinger, M.C. Freeman, M.R. Timpone, The relationship between water sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (12) (2014) e3406, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0340064>.
- [4] T.C.A. Fenton, P.A. Murray, *New schistosomiasis clinical symptoms and pathogenesis*, *Lancet Neurol.* 10 (2011) 833–834.
- [5] F.J. Cerdá-Artaç, Neurological complications of Schistosoma infection, *Trop. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102 (2010) 107–116.
- [6] T.C.A. Fenton, Involvement of distal nervous system in the schistosomiasis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110 (2015) 519–62.
- [7] A.G. Rios, P.B. Bentley, A.C. Singh, G.R. Oka, V.S. Li, G.M. Williams et al., Schistosomiasis, *N. Engl. J. Med.* 346 (2012) 1212–1220.
- [8] R. Caporaso, Schistosomiasis, *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 26 (2012) 183–197.
- [9] Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Guia de vigilância epidemiológica e controle da esquistossomose esquistossomiasis, Série A, Normas e Manuais Técnicos, Ministério da Saúde, Brasília, 2006, 32 pp.
- [10] N. Sandoval, M. Soto-Lacay, J.L. Pérez-Arellano, C. Carrozza, S. Parise, J. López-Albes, et al., A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different Schistosoma species applicable to human urine samples, *Parasitology* 133 (2006) 581–587.
- [11] E.G.C. Alabi, R.F. Wuduanan, E.I. Moku, L. Moshinwa, R. Moshinwa, J.G. Schiller, Singleplex nested PCR using conventional internal primers, *Biochem Biophys Res Commun* 33 (2002) 1210–1214.
- [12] A.J.C. Jacinto, A.M.R. Tiliava, H. Sui, M.H.A. Wilton, M. van der Pijl, S.J. van Hellemond, New insights in diagnosing Schistosoma species using a nested PCR, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) 244–247.
- [13] J. Uttinger, J.K. Nyawai, C.R. Gelfrey, J. Kates, From inspiration to application: socio-epidemiological context, diagnosis, drugs and integrated control of schistosomiasis, *Acta Trop.* 108 (2011) 1521–1537.
- [14] E.E. Morrison, Polymerase chain reaction, *Pract. Neurol.* 2 (2002) 288–293.
- [15] L. Steiner, E. Saitoh-Nishida, J. Seifner, A. Chaudhry, P.G.E. Kennedy, XPM-526: guidelines for use of PCR technology for the diagnosis of infection of the nervous system, *Int. J. Neurol.* 10 (2012) 1276–1297.
- [16] L. Costa, F. Senick, K. Polman, J. Cortes, M. Van, E. Steiner, Schistosoma: real-time PCR as diagnostic tool for intestinal trematode infections, *Tropical Med. Int. Health* 17 (10) (2012) 1208–1216.
- [17] N. Sandoval, M. Soto-Lacay, J.L. Pérez-Arellano, C. Carrozza, S. Parise, J. López-Albes, et al., A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different Schistosoma species applicable to human urine samples, *Parasitology* 133 (2006) 581–587.
- [18] D. Wichterman, M. Parving, Y. Quach, S. Kiamine, C.D. Buchard, C. Gverilid, C. Demiris, Diagnosing schistosomiasis by detection of cat-free parasite DNA in human plasma, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1 (4) (2007) e42.
- [19] L.A. Zhurav, M.C. Oliveira, N. Sato, J. Sato-Nishi, A. Sakai, Connection of a polynucleotide chain marker and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with Schistosoma mansoni, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90 (2013) 652–656.
- [20] E.S. Beaudy, A.S.V. Gomes, C.S. Batista, R.F. Wuduanan, E.G.C. Alabi, Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis, *Trop. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 10 (2010) 1040–1055.
- [21] G. Herten, H. Bräcken, S. Zink, D. Wichterman, B. Assmann, P. Sura, et al., Diagnosis of human schistosomiasis by antibody-quantified index and semi-quantitative real-time PCR from random-urinal and serum, *J. Mol. Microbiol.* 81 (2014) 108–112.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



Título do Projeto: “Desenvolvimento e validação de um kit baseado em Nested-PCR em único tubo para o diagnóstico de esquistossomose em caramujos e em amostras de sangue e urina.”

Pesquisador responsável: Fábio Melo

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 01/10/2013

Registro no CAAE: 16096413.5.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 453.838

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 11 de novembro de 2016.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de fevereiro de 2014.


 Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda
 Pesquisadora em Saúde Pública
 Coordenadora
 Ins: SAPE 464177
 CEP/CPqAM / FIOCRUZ