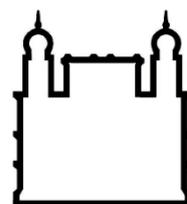




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AValiação DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE MÉTODOS IMUNOLÓGICO E
MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

YASMINE COSTA LARANJEIRAS BORGES

Salvador – Bahia

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE MÉTODOS IMUNOLÓGICO E
MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

YASMINE COSTA LARANJEIRAS BORGES

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Co-Orientador: Dr. Lúcio Macedo Barbosa

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia Humana
para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

B732a Borges, Yasmine Costa Laranjeiras
Avaliação do potencial diagnóstico de métodos imunológico e molecular
para diagnóstico da Esquistossomose Mansônica. / Yasmine Costa Laranjeiras
Borges. - 2018.
84 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de Patologia
e Biologia Molecular.
Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina,
Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo
Cruz, 2018.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose. 3. Diagnóstico. 4. Kato-Katz
5. PCR. I. Título.

CDU 616.995.122

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE MÉTODOS IMUNOLÓGICO E MOLECULAR
PARA DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA".**

YASMINE COSTA LARANJEIRAS BORGES

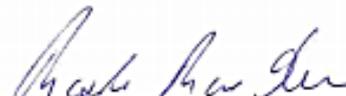
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 27 de dezembro de 2018

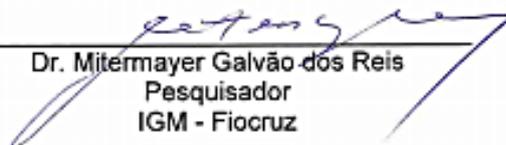
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Fred Luciano Neves Santos
Pesquisador
IGM - Fiocruz



Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
IGM - Fiocruz



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador
IGM - Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CNPq

Dedico esse trabalho à minha mãe, Jane, minha maior referência e meu maior amor, por ter me ensinado a nunca desistir com seu exemplo de força e resiliência diante da vida.

Ao meu pai, Washington, por ser uma fonte perene de inspiração e amor ao conhecimento.

Ao meu noivo, Everton, por me ensinar que o amor se constrói todos os dias com cuidado, zelo, atenção, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir a conclusão de mais uma etapa, por mais uma oportunidade de aprendizado e por estar comigo e me fortalecer todos os dias da minha vida.

Aos meus pais, Jane e Washington, pelo amor incondicional, pelo suporte psicológico e emocional, pelo carinho, pelo cuidado e por nunca me deixarem desistir de mim e das coisas que eu acredito.

Ao meu noivo, Everton, pelo companheirismo, compreensão, parceria, amizade, paciência, cuidado e amor durante todo o meu mestrado, despertando sempre o melhor de mim.

Ao meu orientador, professor Mitermayer Reis, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pela sabedoria, pelas orientações ao longo do trabalho e pela disposição em ensinar e partilhar de suas experiências de vida.

Ao professor Ronald Blanton, pelo entusiasmo em compartilhar seus conhecimentos, pela paciência e alegria ao ensinar e pela incessante capacidade de despertar o melhor de cada aluno.

Ao meu co-orientador, Lúcio Barbosa, pela oportunidade, apoio, ensinamentos compartilhados desde a minha graduação, suporte, conselhos e contribuições.

Aos professores Fred Luciano Santos e Ricardo Riccio, pelo comprometimento, disponibilidade e valiosas contribuições ao trabalho.

Ao Laboratório de Parasitologia Clínica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, pelo suporte em meus experimentos e pelo acolhimento.

Aos colaboradores do Projeto de Esquistossomose em Ubaíra, especialmente à Indiara, pela parceria e pelo apoio nas coletas e nos experimentos, fazendo com que esse estudo fosse possível.

Ao Dr. Luciano Kalabric, pelas importantes contribuições ao trabalho.

À Dra. Theomira Azevedo, pelo conhecimento compartilhado, pelo entusiasmo com que ensina, pela disposição, pelo otimismo e pelo apoio.

Aos meus amigos do grupo de Esquistossomose do LPBM, pela amizade, pelo acolhimento, pelo carinho e pela alegria em compartilhar dessa trajetória.

À Vanessa Moretto, Vanessa Zanardi e Pedro Muccillo, pelo inestimável auxílio, pela paciência, pelo apoio, pela amizade e pelas conversas e experimentos, que geraram aprendizado.

À Paula Barbosa e Patrícia Moreira, colegas do LPBM, por terem sido companheiras de jornada nos experimentos da noite e dos fins de semana.

A Cleiton Guimarães, pela amizade, pelo suporte administrativo e pelo apoio em tempo integral.

À Ana Carolina Costa, pelo apoio, pela paciência e pelo suporte administrativo.

A Gilmar Ribeiro Jr., pelo suporte e pelas contribuições.

À Biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz, pelo suporte, apoio, colaboração e disponibilidade.

À Lívia Oliveira, pela paciência, apoio, colaboração, disponibilidade, suporte e amizade, que tornou possível a conclusão desse trabalho. Obrigada por tudo!

Aos meus colegas de trabalho, Erenice Reis, Tiago Pereira, Jossere Carvalho, Flávia Carneiro, Cléa Cerdeira e Gilmar Sampaio, pelo apoio, ânimo e suporte que tornaram possível a execução desse trabalho. Obrigado por cada palavra de incentivo e esperança.

Aos meus familiares, pelo carinho, pelo incentivo e pelo entusiasmo em cada conquista.

Aos meus amigos, pelo otimismo, pela alegria, pelo incentivo e pelo suporte emocional, que alegrou os meus dias durante a execução desse trabalho.

“O homem é corda estendida entre o animal e o Super-homem: uma corda sobre o abismo.

Perigosa travessia, perigoso caminhar, perigoso olhar para trás, perigoso tremer e parar.

O grande do homem é ele ser ponte, e não uma meta.

O que se pode amar no homem é ele ser uma transição e não um ocaso.

É preciso ter um caos dentro de si para dar à luz uma estrela que dança”.

(Friedrich Nietzsche)

BORGES, Yasmine Costa Laranjeiras. Avaliação do potencial diagnóstico de métodos imunológico e molecular para diagnóstico da Esquistossomose Mansônica. 84 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. A doença está entre as principais doenças tropicais negligenciadas. No Brasil, a esquistossomose é endêmica, distribuindo-se, principalmente, em estados do Nordeste. O método padrão-ouro para diagnóstico da doença, segundo a Organização Mundial de Saúde, é o Kato-Katz. Porém, a técnica apresenta diminuição da sensibilidade em áreas de baixa endemicidade, além da dificuldade de aquisição de amostras de fezes em dias diferentes e alternados e da necessidade de expertise de um profissional para análise das lâminas. Dentro desse contexto, outras metodologias têm se apresentado como boas alternativas para o diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade, tais como o teste imunológico de POC-CCA e o teste molecular de rt-PCR. **OBJETIVO:** O presente estudo visou avaliar o desempenho do método imunológico de POC-CCA e o método molecular de PCR em tempo real para diagnóstico da esquistossomose mansônica em áreas de baixa endemicidade, em relação ao padrão ouro, o método parasitológico de Kato-Katz. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram avaliados 121 indivíduos da comunidade rural de Jenipapo, município de Ubaíra, Bahia, com faixas etárias entre 2 e 80 anos. Cada indivíduo forneceu uma amostra de urina e uma amostra de fezes. Para execução do Kato-Katz e PCR em tempo real, foram utilizadas as amostras de fezes. Para a execução do POC-CCA, foram utilizadas as amostras de urina. Foram determinadas intensidade de infecção e taxas de prevalência e o desempenho diagnóstico foi avaliado através dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia. O índice Kappa avaliou a concordância dos resultados entre observadores do teste rápido de POC-CCA. O método padrão ouro do estudo é o Kato-Katz. **RESULTADOS:** O maior número de indivíduos positivos foi encontrado pelo Kato-Katz (32), seguido pelo POC-CCA (25) e rt-PCR (18). O POC-CCA apresentou um desempenho mais inconsistente, com sensibilidade de 43,8%, especificidade de 87,6% e acurácia de 76%. A intensidade de cor da reação foi mais forte em indivíduos com alta e média cargas parasitárias. Já o rt-PCR apresentou sensibilidade de 56,2%, especificidade de 100% e acurácia de 88,4%. O índice Kappa demonstrou que houve uma forte concordância entre os observadores do teste POC-CCA ($k=0,94$). Segundo os índices de acurácia obtidos, o melhor teste foi o rt-PCR (88,4%). **CONCLUSÕES:** Os resultados demonstram que o método de Kato-Katz é uma boa técnica a se utilizar para triagem e controle de morbidade. O POC-CCA apresentou resultados inconsistentes, não sendo uma boa alternativa para triagem ou diagnóstico. Houve correlação entre a intensidade de carga parasitária e a intensidade de coloração da reação no teste de POC-CCA. O rt-PCR se mostrou uma alternativa viável, apesar do alto custo. A associação entre o método parasitológico de Kato-Katz e o método molecular de rt-PCR é uma boa alternativa para o controle de transmissão e diagnóstico, por apresentar aumento na sensibilidade, o que pode aprimorar o diagnóstico em áreas de baixa endemicidade.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Esquistossomose; Diagnóstico; Kato-Katz; POC-CCA; PCR.

BORGES, Yasmine Costa Laranjeiras. Evaluation of diagnostic potencial of immunological and molecular methods for the diagnosis of Mansonic Schistosomiasis. 84 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. The disease is among the top neglected tropical diseases. In Brazil, schistosomiasis is endemic, being distributed, mainly, in Northeastern states. The gold-standard method for diagnosing the disease, according to the World Health Organization, is Kato-Katz. However, the technique shows a decrease in sensitivity in areas of low endemicity, besides the difficulty of acquiring faecal samples on different and alternating days and the need for professional expertise to analyze the blades. Within this context, other methodologies have been presented as good alternatives for the diagnosis of schistosomiasis in areas of low endemicity, such as the POC-CCA immunological test and the molecular rt-PCR test. **AIM:** The present study aimed to evaluate the performance of the POC-CCA immunological method and the real-time PCR molecular method for the diagnosis of schistosomiasis mansoni in areas of low endemicity, in relation to the gold standard, the Kato-Katz parasitological method. **MATERIAL AND METHODS:** 121 individuals from the rural community of Jenipapo, Ubaíra, Bahia, Brazil, aged between 2 and 80 years, were evaluated. Each individual provided a urine sample and a stool sample. For the Kato-Katz and real-time PCR, fecal samples were used. For the implementation of POC-CCA, the urine samples were used. Infection intensity and prevalence rates were determined and diagnostic performance was assessed through the parameters of sensitivity, specificity and accuracy. The Kappa index assessed the agreement of results among observers of the POC-CCA rapid test. The gold standard method of study is the Kato-Katz. **RESULTS:** The highest number of positive individuals was found by Kato-Katz (32), followed by POC-CCA (25) and rt-PCR (18). The POC-CCA presented a more inconsistent performance, with sensitivity of 43.8%, specificity of 87.6% and accuracy of 76%. The color intensity of the reaction was stronger in individuals with high and medium parasitic loads. The rt-PCR showed sensitivity of 56.2%, specificity of 100% and accuracy of 88.4%. The Kappa index showed that there was a strong agreement among the observers of the POC-CCA test ($k = 0.94$). According to the accuracy indexes obtained, the best test was rt-PCR (88.4%). **CONCLUSIONS:** The results demonstrate that the Kato-Katz method is a good technique to use for screening and morbidity control. The POC-CCA presented inconsistent results, not being a good alternative for screening or diagnosis. There was a correlation between the parasite load intensity and the reaction staining intensity in the POC-CCA test. The rt-PCR proved to be a viable alternative, despite the high cost. The association between the Kato-Katz parasitological method and the molecular method of rt-PCR is a good alternative for the control of transmission and diagnosis, since it presents an increase in sensitivity, which may improve the diagnosis in areas of low endemicity.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Schistosomiasis; Diagnosis; Kato-Katz; POC-CCA; PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa de distribuição mundial da esquistossomose, segundo a prevalência.....	18
Figura 2	Distribuição da esquistossomose no Brasil, segundo o INPEG 2010/2015.....	19
Figura 3	Distribuição da esquistossomose de acordo com o grau de risco para transmissão da esquistossomose, no estado da Bahia.....	20
Figura 4	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Quadro 1	Exames parasitológicos para diagnóstico da esquistossomose mansônica.	25
Quadro 2	Classificação da intensidade de infecção por <i>S. mansoni</i> , com base no número de ovos eliminados por grama de fezes.....	25
Figura 5	Desenho esquemático do POC-CCA.....	28
Figura 6	Desenho esquemático do POC-CCA, evidenciando as reações em testes positivo e negativo.....	29
Figura 7	Representação esquemática das 3 fases que constituem a PCR em tempo real.....	31
Figura 8	Localização geográfica da área de estudo, destacando o município de Ubaíra.....	36
Figura 9	Fluxograma das etapas envolvidas na seleção da população de estudo.....	38
Figura 10	Teste rápido de POC-CCA.....	41
Figura 11	Resultados dos testes rápidos de urina, de acordo com o padrão de bandas.....	42
Figura 12	Perfil populacional de acordo com a percentagem de gênero dos participantes.....	47
Figura 13	Perfil populacional de acordo com a faixa etária dos participantes.....	48
Figura 14	Prevalência da esquistossomose relacionada à faixa etária e intensidade de infecção dos participantes do estudo.....	49
Figura 15	Distribuição do número de indivíduos com baixa carga parasitária.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela 2x2 e fórmulas de cálculo dos principais parâmetros analisados no estudo	46
Tabela 2	Tabela de prevalência obtida pela técnica de POC-CCA, considerando critério do fabricante	50
Tabela 3	Tabela de resultados obtidos pela técnica de POC-CCA, considerando critério do estudo	51
Tabela 4	Avaliação do POC-CCA para diagnóstico de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> , considerando o critério de interpretação do fabricante	51
Tabela 5	Avaliação do POC-CCA para diagnóstico de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> , considerando o critério proposto pelo estudo	52
Tabela 6	Tabela de resultados obtidos pela técnica de rt-PCR	52
Tabela 7	Avaliação do rt-PCR para diagnóstico de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	53
Tabela 8	Avaliação do rt-PCR x POC-CCA para diagnóstico de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> , considerando o critério proposto pelo fabricante	54
Tabela 9	Avaliação do rt-PCR x POC-CCA para diagnóstico de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> , considerando o critério proposto pelo estudo	54
Tabela 10	Síntese e comparação dos parâmetros estatísticos obtidos a partir dos resultados apresentados pelos diferentes métodos diagnósticos	55

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	A ESQUISTOSSOMOSE.....	16
1.2	EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL E NO MUNDO.....	17
1.3	CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA.....	20
1.4	ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE.....	23
1.5	DIAGNÓSTICO.....	24
1.5.1	Métodos Parasitológicos	24
1.5.1.1	Kato-Katz.....	26
1.5.2	Métodos Imunológicos	26
1.5.2.1	Teste Rápido: POC-CCA (<i>point-of-care circulating cathodic antigen</i>).....	27
1.5.3	Métodos Moleculares	30
1.5.3.1	PCR em Tempo Real.....	30
2.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	33
3.	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	ÁREA DE ESTUDO.....	36
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	37
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	38
4.4	COLETA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS.....	39
4.5	DIAGNÓSTICO.....	39
4.5.1	Método Parasitológico de Kato-Katz	39
4.5.2	Método Imunológico de POC-CCA	40
4.5.3	Extração de DNA	42
4.5.4	Método Molecular de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real	43
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4.6.1	Intensidade de Infecção	44
4.6.2	Padrão Ouro, Prevalência e Taxa de Positividade	44

4.6.3	Parâmetros Utilizados na Avaliação de Desempenho Diagnóstico das Técnicas	45
5.	RESULTADOS	47
5.1	PERFIL POPULACIONAL.....	47
5.2	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG).....	49
5.3	MÉTODO DE POC-CCA.....	50
5.4	MÉTODO DE rt-PCR.....	52
5.5	AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE POC-CCA E rt-PCR.....	53
5.6	SÍNTESE E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS OBERVADOS NOS DIFERENTES MÉTODOS.....	55
6.	DISCUSSÃO	56
7.	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	79
	ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	79
	ANEXO II: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA CRIANÇAS DE 7 A 13 ANOS.....	81
	ANEXO III: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA ADOLESCENTES DE 14 A 17 ANOS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 A ESQUISTOSSOMOSE

Conhecida como xistose, barriga d'água ou bilharzia, a esquistossomose é uma doença parasitária tropical, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* (SOUSA, 2015). Os primeiros registros da esquistossomose foram feitos nas bacias dos rios Nilo, na África, e Yangtze, na Ásia. A partir destes pontos de origem, disseminou-se para outros continentes, seguindo os fluxos migratórios (PORDEUS, 2008).

A esquistossomose está entre as principais doenças tropicais negligenciadas (DTN) (COLLEY et al, 2013), ocupando a segunda posição em importância, depois da malária (CAVALCANTI e PERALTA, 2015). As doenças negligenciadas prevalecem em países subdesenvolvidos e favorecem a manutenção da desigualdade social, representando um importante problema de Saúde Pública. (DECIT, 2010).

Em 1852, Theodor Bilharz fez a primeira descrição de ovos com a presença de espículas lateral e terminal (PRATA, 2008b). O médico inglês Patrick Manson, em 1902, observou a presença de ovos com espícula lateral presentes nas fezes de um indivíduo que vivera na Índia Ocidental (KATZ, 2008). O helmintologista Arthur Looss alegava que os ovos com espícula lateral eram apenas formas inférteis do *Schistosoma haematobium*, embora as observações feitas sobre a posição das espículas apontassem para a descoberta de uma nova espécie de *Schistosoma*. Em 1904, no Hospital Santa Izabel, em Salvador – Bahia, Pirajá da Silva observou nas fezes de pacientes a presença de ovos com espícula lateral, com características semelhantes às descritas por Manson (PIRAJÁ, 1908a). Além disso, a partir de autópsias realizadas em pacientes com esquistossomose, Pirajá da Silva também descreveu morfologicamente vermes adultos acasalados e observou a presença de ovos com espícula lateral no interior da fêmea (PIRAJÁ, 1908b). A descrição completa do parasito foi realizada através de suas observações e relatos, descobrindo-se, portanto, uma nova espécie de *Schistosoma*.

Diversas espécies desse gênero têm a capacidade de parasitar o homem e apresentam relevância médica e epidemiológica. O *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) causa formas hepatoesplênica e intestinal da doença, sendo encontrado apenas na Ásia, principalmente na China e nas Filipinas. A forma urinária da esquistossomose é causada pelo *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1851), o qual é encontrado na África e na Península

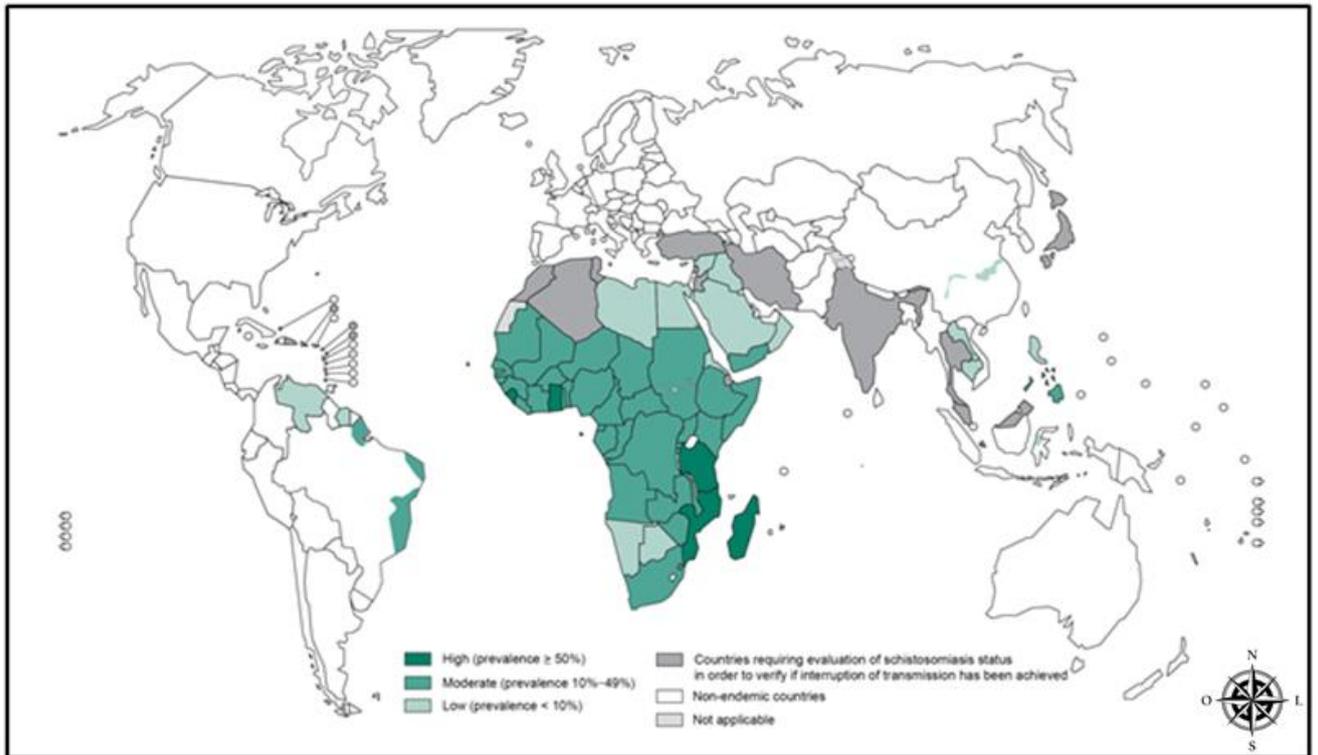
Arábica. As espécies *Schistosoma intercalatum* (Fisher, 1934) e *Schistosoma mekongi* (Voge, Bruckner e Bruce, 1978) causam a esquistossomose intestinal e possuem relevância médica nos países da África Central e Sudoeste Asiático. A única espécie encontrada no Brasil é o *Schistosoma mansoni*, responsável pela esquistossomose mansônica hepática e intestinal. Esta espécie também pode ser encontrada em outros países da América do Sul, Península Arábica e África (KATZ; ALMEIDA, 2003; GRYSEELS, 2012).

Atualmente, a esquistossomose é encontrada em 72 países em todos os continentes e é uma doença endêmica em, pelo menos, 52 deles (FREITAS et al, 2016). É considerada a segunda doença parasitária com maior prevalência e a terceira com maiores impactos socioeconômicos e de saúde pública (JONG, 2012; ELBAZ, 2013; CDC, 2016).

1.2 EPIDEMIOLOGIA NO MUNDO E NO BRASIL

A esquistossomose mata mais de 100.000 pessoas por ano, com a maioria dos casos ocorrendo na África, no Mediterrâneo Oriental e nas Américas (McADAM; SHARPE, 2010; ROLLEMBERG et al, 2010). Estima-se que cerca de 700 milhões de pessoas vivem em regiões endêmicas, sob risco de se infectar, e que 240 milhões são afetadas pela doença em todo o mundo (STEINMANN et al. 2006; WHO, 2016). Contabilizam-se, ainda, cerca de 280.000 óbitos por ano, devido ao parasitismo e suas complicações (VAN DER WERF et al, 2003). A Figura 1 apresenta a distribuição da esquistossomose no mundo, considerando-se a prevalência da doença.

Figura 1: Mapa de distribuição mundial da esquistossomose, segundo a prevalência



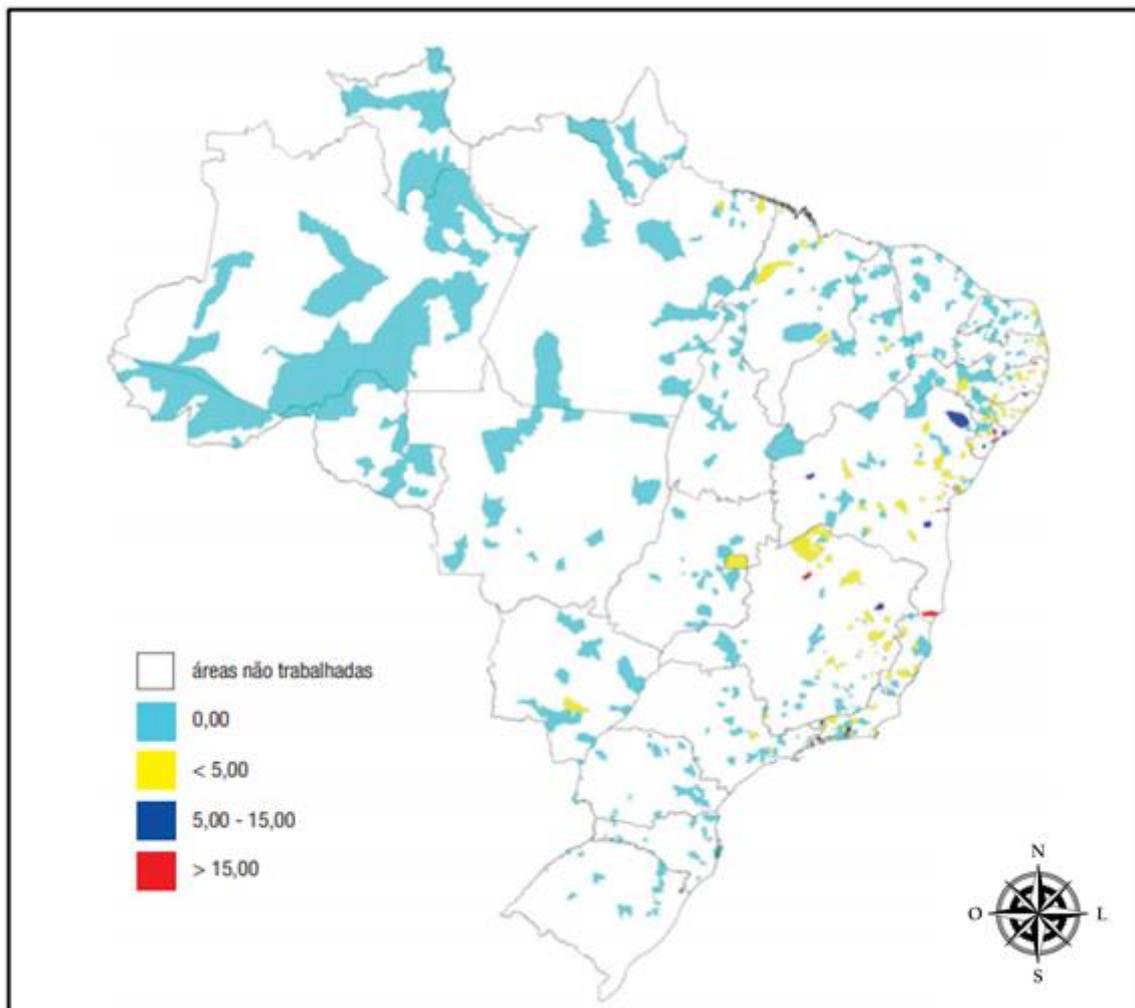
Fonte: WHO, 2012.

Nas Américas, Brasil, Suriname e Venezuela são considerados endêmicos para a esquistossomose mansônica, com elevadas taxas de transmissão, visto que a doença se estabelece em regiões onde o saneamento básico é ausente ou inadequado, permitindo que as formas infectantes do parasito encontrem coleções hídricas e infectem o homem pela mucosa ou pele íntegra (BARBOSA et al, 1996). O Brasil possui 95% dos casos e estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *S. mansoni* (ROLLINSON et al, 2013).

No Brasil, estima-se que 30 milhões de pessoas vivam em áreas de risco (WHO, 2010; SARVEL et al, 2011; LEAL, et al, 2012). As taxas e a intensidade da infecção sofrem influências dentro de grupos populacionais, de acordo com seus padrões de contato com a água, da imunidade adquirida e dos fatores comportamentais, profissionais, culturais e religiosos (SOUSA, 2015). Devido ao grande número de pessoas afetadas e aos constantes deslocamentos da população por motivos diversos, os portadores são diagnosticados em todo o Brasil (TELES, 2005). Em 19 estados do Brasil pode ser observada a transmissão da esquistossomose (BRASIL, 2014).

A transmissão da doença é de baixa intensidade nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal (Figura 2). Já as áreas endêmicas estão localizadas na região Sudeste (Espírito Santo e Minas Gerais) e na região Nordeste (Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Rio Grande do Norte, Bahia e Paraíba) (KATZ, 2018).

Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil, segundo o INPEG 2010/2015.



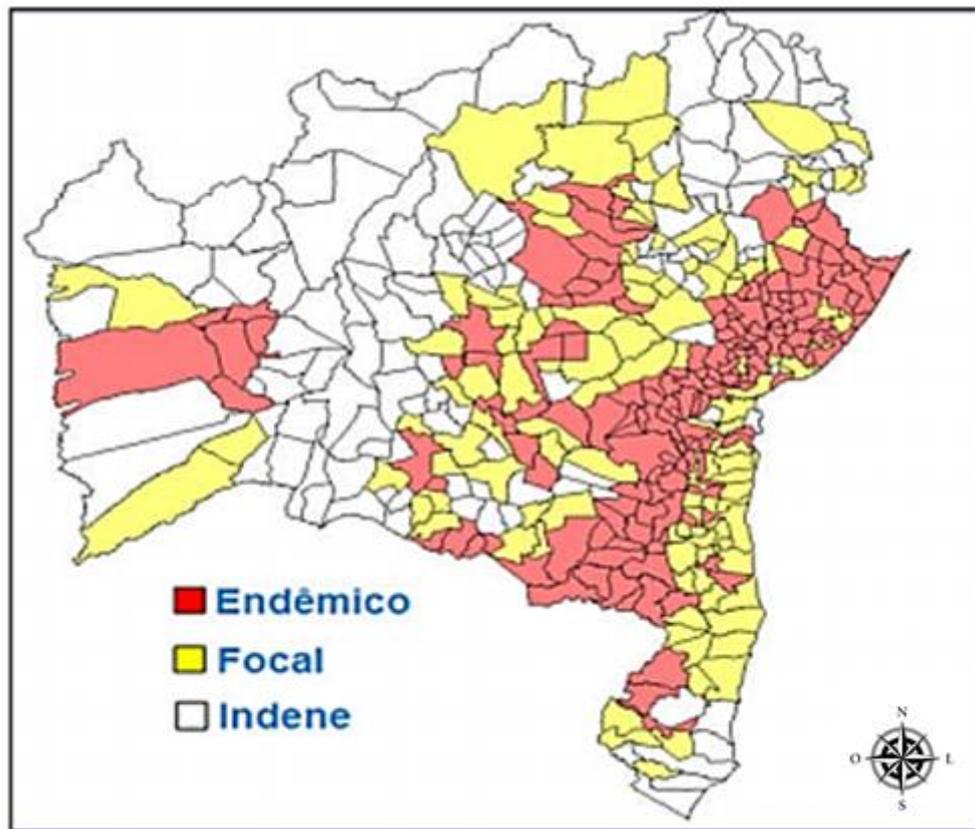
Fonte: KATZ, 2018.

A transmissão da esquistossomose é favorecida por diversos fatores: cronicidade da doença, fazendo com os indivíduos não procurem centros médicos para diagnóstico e tratamento; grande quantidade de ovos eliminados pelas fêmeas diariamente (média de 300 ovos/dia); vermes adultos com longevidade e contínua manutenção da capacidade reprodutiva

ao longo de décadas; e persistência de precárias condições de saneamento básico, tanto na zona rural quanto na periferia dos grandes centros urbanos, possibilitando a contaminação das coleções d'água (BRASIL, 2014).

A Bahia é o segundo estado com maior área endêmica. Dos 417 municípios, 167, incluindo a cidade de Salvador, são considerados endêmicos para a esquistossomose (DIVEP-SUVISA, 2018). A prevalência da doença no estado é de 5,4% (BRASIL, 2011). A Figura 3 mostra a distribuição dos municípios baianos segundo grau de risco de transmissão da doença.

Figura 3: Distribuição da esquistossomose de acordo com o grau de risco para transmissão da esquistossomose, no estado da Bahia.



Fonte: Ministério da Saúde, 2018.

1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA

O ciclo biológico do *S. mansoni* é classificado como heteroxênico, ocorrendo com reprodução sexuada no hospedeiro definitivo (principalmente o homem) e com reprodução

assexuada no hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*), alternadamente (LEWIS; TUCKER, 2014).

A transmissão da esquistossomose nos humanos ocorre pelo contato com coleções hídricas contendo caramujos infectados pelo parasito. (CHISTULO; LOVERDE; ENGELS, 2004; MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2014). As etapas evolutivas consistem em ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto. O ciclo evolutivo do parasito se completa em torno de 80 dias, em condições favoráveis (REY, 1991).

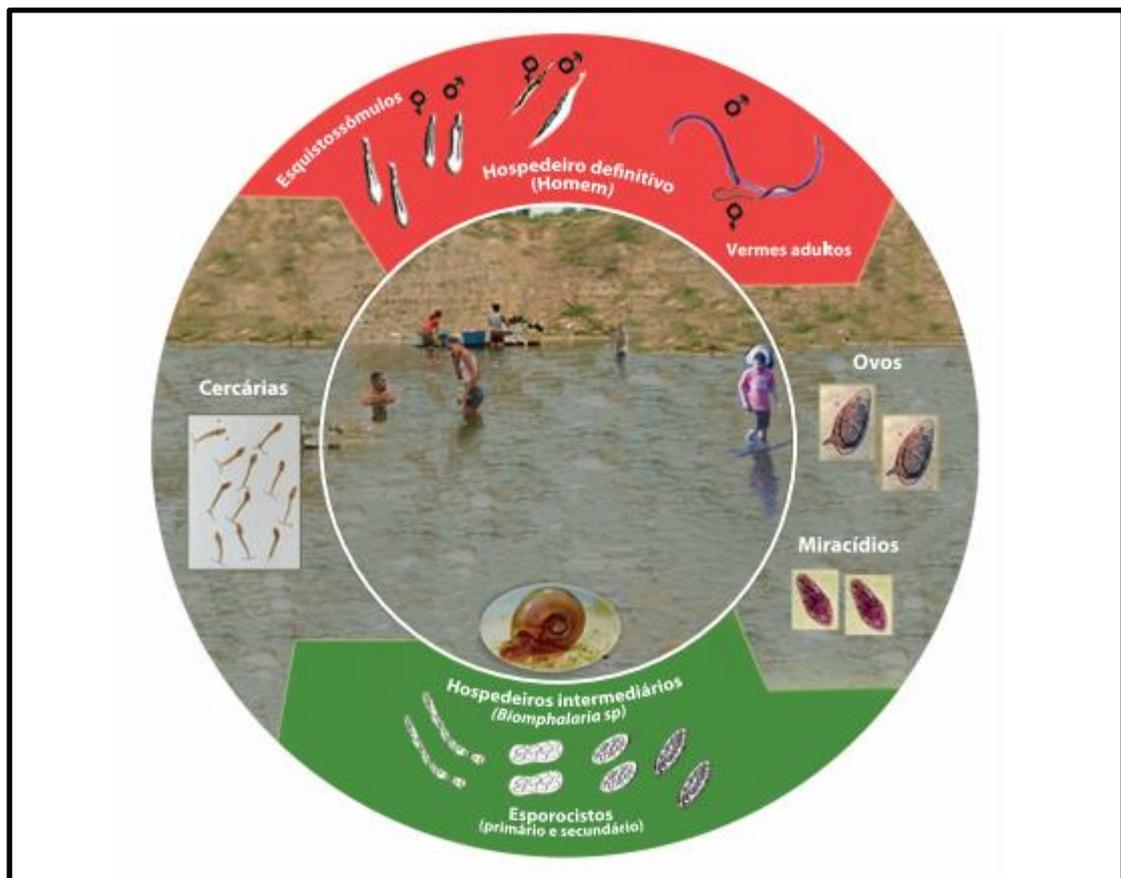
O ciclo biológico do *S. mansoni* (Figura 4) se inicia quando as fezes dos indivíduos infectados, contendo ovos maduros com presença do parasito, entram em contato com a água. Na água, os ovos eclodem e liberam larvas ciliadas, denominadas miracídios. Os miracídios são estimulados por fototropismo e termotropismo a deixarem os ovos maduros. Consistem o primeiro estágio de vida livre do *Schistosoma*. Os miracídios se movimentam ativamente na água por um período de 6 a 12 horas, e penetram nos caramujos, processo que dura de 10 a 15 minutos. Ao penetrar nos moluscos, o miracídio perde parte de suas estruturas (GRYSEELS et al, 2006; INOBAYA et al, 2014).

As células remanescentes se reorganizam e, em 48 horas, transformam-se em um saco alongado, repleto de células germinativas, denominado esporocisto (GOMES, 2008). Sofrendo diferenciação, as células germinativas formam esporocistos secundários, os quais migram para as regiões do hepatopâncreas e do ovotéstis dos moluscos (Rey, 1991), levando à formação das cercárias após, aproximadamente, 4 a 6 semanas da penetração do miracídio (GRYSEELS et al, 2006; INOBAYA et al, 2014).

A cercária é uma larva com corpo e cauda, pode sobreviver até 72 horas no ambiente aquático. Ela é liberada na água por meio de vesículas formadas no tegumento do caramujo e representa a forma infectante para o hospedeiro definitivo. Na água, as cercárias apresentam fototropismo positivo, ficando na superfície, em busca do hospedeiro definitivo (GRYSEELS, 2006). A penetração no hospedeiro definitivo através das mucosas e pele é consumada pela ação lítica e pela ação mecânica, devido aos movimentos intensos das larvas. Ao atravessar a pele, a cercária perde a cauda e passa a esquistossômulo, reorganizando o seu tegumento. Ela possui quimiotropismo por alguns ácidos graxos, como o ácido linoleico, assim como os miracídios (REY, 1991).

Os esquistossômulos são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro e penetram em seus vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, sendo transportados em direção aos pulmões por via sanguínea ou transtissular (INGRAM et al, 2003). Após 17 dias, os esquistossômulos chegam ao fígado, onde ocorrerá o desenvolvimento dos vermes e início da ovoposição (LENZI et al, 2008). Em 40 dias, a presença de ovos nas fezes já pode ser detectada (REY, 1991). Um verme vive, em média, 3 a 5 anos, podendo atingir até 30 anos (GRYSEELS, 2006). A fêmea do *S. mansoni* pode liberar até 300 ovos por dia, parte dos quais fica retida na parede intestinal ou nos pequenos espaços da veia porta. A outra é eliminada nas fezes (LENZI et al, 2008).

Figura 4: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Carvalho et al, 2008.

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE

As manifestações clínicas da esquistossomose mansônica estão diretamente associadas à intensidade de infecção. Na fase aguda, não são encontrados ovos nas fezes. Esta fase, normalmente conhecida como fase aguda pré-postural ou dermatite cercariana, apresenta manifestações decorrentes da reação de hipersensibilidade à penetração das cercárias, como prurido cutâneo, edema e eritema. Inicia-se entre 24 e 72 horas após a penetração cercariana. Na maioria dos casos, a fase aguda é assintomática, principalmente em indivíduos residentes em áreas endêmicas (JAURÈGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2010).

A evolução da esquistossomose mansônica para a forma crônica induz uma reação inflamatória do tipo granulomatosa, decorrente da resposta imune às enzimas proteolíticas e aos produtos da excreção e secreção liberados pelos miracídeos presentes em ovos retidos nos tecidos. As formas clínicas também variam nessa fase, podendo ser crônica discreta, com as formas hepatointestinal e intestinal, ou crônica avançada ou grave, com a forma hepatoesplênica (GRYSEELS; STRICKLAND et al, 2013).

A forma intestinal apresenta manifestações como presença de diarreia, emagrecimento, dores abdominais e perda de apetite. Já a forma hepatointestinal, apresenta discreta hepatomegalia, principalmente no lobo esquerdo do fígado (VITORINO et al, 2012). A forma hepatoesplênica é caracterizada pela fibrose hepática periportal (fibrose de Symmers), com obstrução do sistema da veia porta, podendo vir acompanhada de lesões obstrutivas e destrutivas. Também pode ser observada presença de varizes no esôfago e hipertensão portal associada à esplenomegalia (PRATA; COURA et al, 2008).

Grande parte dos indivíduos infectados se encontra nas formas clínicas discretas, caracterizadas pela presença de ovos viáveis nas fezes, podendo ser assintomáticos ou com sintomas inespecíficos e discretos. O estudo de Silva e colaboradores, em 2018, demonstrou que indivíduos assintomáticos apresentaram alterações discretas de enzimas hepáticas, resultando em função hepática pouco discretamente alterada (SILVA et al, 2018).

Além das formas clínicas já apresentadas anteriormente, a esquistossomose mansônica pode ter formas ectópicas, que ocorrem quando o parasita se estabelece em regiões atípicas (fora do sistema porta-hepático) (ANDRADE, 2008). A neuroesquistossomose é considerada como a forma mais grave, com presença de ovos de *S. mansoni* ou pela deposição de

complexos imunes, levando ao comprometimento do sistema nervoso (FERRARI, 2008; ANDRADE FILHO et al, 2015).

1.5 DIAGNÓSTICO

Os métodos diagnósticos para esquistossomose podem ser classificados em quatro categorias: métodos de detecção direta, métodos de detecção indireta, métodos qualitativos e métodos quantitativos. Os métodos de detecção direta verificam a presença de ovos, fragmentos ou do parasito. Os métodos de detecção indireta identificam a presença do parasito através de marcadores bioquímicos, clínicos ou imunológicos. Os métodos qualitativos identificam os tipos de parasitos e são classificados como positivo (presença do parasito) ou negativo (ausência do parasito). Já os métodos quantitativos identificam a presença do parasito e determinam o número de ovos por gramas de fezes, possibilitando que se estime a carga parasitária (FERREIRA, 2016). O diagnóstico da esquistossomose é realizado através da identificação de ovos do *Schistosoma mansoni* em fezes por meio dos exames parasitológicos (EPF) ou por biópsia retal. O método considerado como padrão ouro pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Organização Mundial de Saúde é o Kato-Katz (BARBOSA et al, 2017).

1.5.1 Métodos Parasitológicos

No geral, os métodos parasitológicos de fezes baseiam-se em verificações macroscópicas e microscópicas. Na análise macroscópica, observa-se a consistência e odor fecais, bem como a presença de sangue ou fragmentos do parasito. Já na análise microscópica, observa-se a presença de ovos ou larvas dos parasitos eliminados nas fezes (OLIVEIRA, 2015). Os métodos parasitológicos podem ainda ser divididos em qualitativos e quantitativos (Quadro 1).

Quadro 1: Exames parasitológicos para diagnóstico da esquistossomose mansônica.

Métodos qualitativos	Métodos quantitativos
Método de sedimentação espontânea (HPJ)	Método Kato-Katz
Método flutuação	Método de eclosão de miracídios
Método de centrifugação em éter sulfúrico	Gradiente salínico
Método Centrífugo-sedimentação (MIFC)	Helmintex
Reação peri-ovular	

Fonte: FERREIRA, 2016.

As técnicas qualitativas detectam a presença de ovos do parasito nas fezes (Siqueira, 2015). Dentre eles estão os métodos de sedimentação espontânea ou HPJ (Lutz, 1919; modificado por Hoffmann et al, 1934) e o centrífugo-sedimentação (MIFC) ou Método de Blagg (BLAGG et al, 1955). Todos eles possibilitam a investigação de vários parasitas intestinais e são amplamente utilizados na rotina laboratorial, em função do baixo custo e simplicidade operacional. Já as técnicas quantitativas determinam a quantidade de ovos eliminados por grama de fezes, possibilitando estimar a intensidade da carga parasitária do hospedeiro (Quadro 2) (Oliveira, 2015; Siqueira, 2015). A técnica de Kato-Katz (Katz et al, 1972), a técnica de eclosão de miracídios (Zicker et al, 1977; Jurberg et al, 2008), Gradiente Salino (Coelho et al, 2009) e Helmitex (Teixeira et al, 2007) são classificadas como quantitativas.

Quadro 2: Classificação da intensidade de infecção por *S. mansoni*, com base no número de ovos eliminados por grama de fezes.

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

Fonte: WHO, 2012.

1.5.1.1 Kato-Katz

A técnica de Kato e Miura (1954) tornou-se conhecida internacionalmente em 1966. Foi modificada em 1972 por Katz et al, passando a se denominar método de Kato-Katz. Eles simplificaram a técnica, substituindo a pesagem das fezes com balança por um cartão com orifício central de 6 mm de diâmetro, padronizando a quantidade de fezes a ser examinada (42 mg).

Esta metodologia permite identificar e quantificar os ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes. A presença de um único ovo confirma um quadro de doença ativa; a ausência de ovos, porém, não exclui a infecção. Portanto, o resultado negativo não significa ausência de infecção (CHIEFFI e KANAMURA, 1978).

O método de Kato-Katz é largamente utilizado pelo baixo custo operacional e viabilidade em situações de infraestrutura laboratorial precária (RABELLO, 1997). Além disso, não utiliza reagentes tóxicos e é de simples execução (EBRAHIM et al, 1997). No entanto, a técnica com uma única amostra de fezes, particularmente em regiões onde os indivíduos foram submetidos a tratamento quimioterápico ou áreas de baixa endemicidade, pode subestimar a prevalência e intensidade da infecção, enquanto as taxas de cura podem ser superestimadas (DE VLAS, 1992; UTZINGER et al, 2001). Sendo assim, o método de Kato-Katz é capaz de diagnosticar, eficazmente, infecções moderadas e intensas, o que não ocorre quando há uma reduzida eliminação de ovos, como nas infecções com baixa carga parasitária (DE VLAS; GRYSEELS, 1992).

1.5.2 Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos detectam anticorpos ou antígenos circulantes e têm se mostrado eficazes na triagem de indivíduos infectados com baixa intensidade de infecção ou com infecções crônicas, as quais limitam o diagnóstico por métodos coproscópicos (CHIEFFI e KANAMURA, 1978). Além disso, os métodos imunológicos também agilizam o diagnóstico da doença, já que os parasitológicos seguem metodologias laboriosas (VAN LIESHOUT et al, 2000; DOENHOFF et al, 2004).

Os métodos imunológicos podem ser classificados como diretos e indiretos. Os diretos são capazes de identificar antígenos circulantes específicos. Já os indiretos são capazes de detectar anticorpos produzidos contra o parasito (DE JONGE et al, 1991). Durante vários estágios do ciclo

de vida do parasito são produzidos antígenos circulantes, classificados de acordo com o estágio evolutivo do parasito: antígeno cercariano (Abdel-Hafez et al, 1983), do ovo (Ripert et al, 1988; Hassan et al, 1992; Nour El Din, 1994) e antígenos associados ao intestino do verme adulto (QIAN E DEELDER, 1982; DEELDER et al, 1994). Estes são os antígenos identificados pelos métodos diretos. Já para a detecção de anticorpos, preparações antigênicas são produzidas em diferentes estágios evolutivos do parasito. Os antígenos mais usados são SWAP (*soluble worm antigen preparation*), provenientes de vermes adultos e SEA (*soluble eggs antigen*), que são antígenos solúveis dos ovos. Dentre os testes imunológicos comercialmente disponíveis, podem ser encontrados *kits* de ELISA e *kits* de reação de hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti-*S. mansoni*. Os ensaios para detecção de anticorpos e antígenos são estratégias promissoras complementares ao exame parasitológico.

1.5.2.1 Teste Rápido: POC-CCA (*point-of-care circulating cathodic antigen*)

A liberação de antígenos na circulação do hospedeiro ocorre através da regurgitação de conteúdos não digeridos do intestino do verme, já que o *S. mansoni* possui sistema digestório incompleto (cavidade digestiva ligada a apenas um orifício de saída). Sendo assim, o verme utiliza a ventosa oral para alimentação e eliminação de resíduos (HOCKLEY, 1973). Os dois principais antígenos associados ao intestino do *Schistosoma* são o antígeno catódico circulante (CCA) e antígeno anódico circulante (CAA).

O POC-CCA é um método de imunodiagnóstico que detecta o antígeno circulante específico CCA (DEELDER et al., 1994), em amostras de urina (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul). É um teste imunocromatográfico composto por uma membrana de nitrocelulose, com um conjugado de carbono coloidal do anticorpo monoclonal específico para CCA. O princípio do teste rápido foi desenvolvido por Van Etten e colaboradores, em 1994, e posteriormente reproduzido por Van Dam et al, em 2004. É um teste de imunocromatografia, que utiliza combinação de dois anticorpos monoclonais anti-CCA, identificados por Deelder e colaboradores, em 1989.

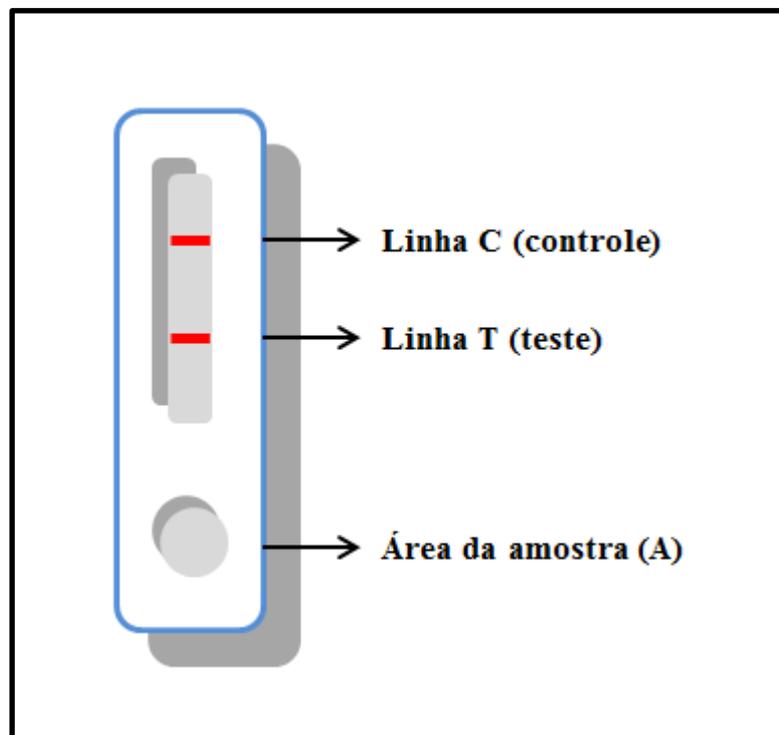
O antígeno catódico circulante (CCA) é um polissacarídeo carregado positivamente pela imunoeletroforese, estável ao calor e de baixo peso molecular. Ele foi demonstrado em soro e urina de camundongos infectados em produtos excretados e secretados pelo verme adulto (DEELDER et al, 1976). O CCA já foi encontrado também em diferentes tecidos e amostras clínicas: soro e urina (Berggren et al, 1967; Gold et al, 1969; Carlier et al, 1975;

Deelder et al, 1976); leite (Santoro et al, 1977); rim, fígado e baço (Deelder et al, 1980; Deelder et al, 1985; Sobh et al, 1987). No entanto, verificou-se que, embora presente no soro, o CCA é melhor detectado na urina e que a sua concentração diminui rapidamente após tratamento quimioterápico (Van't Wout et al, 1992; Van Lieshout et al, 1993). Logo, o teste vem apresentando-se como alternativa diagnóstica de infecções ativas causadas por *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Deelder et al, 1989; De Jonge et al, 1991; Van Etten et, 1994). No entanto, a acurácia diagnóstica varia de acordo com a prevalência e a intensidade de infecção.

O cassete plástico para realização do teste é dividido em três áreas (Figura 5):

- Área da amostra (A): onde se aplica a amostra.
- Linha T: contém os antígenos fixados à membrana de nitrocelulose, onde se obtém o resultado da amostra testada.
- Linha C: área de controle da reação e que permite validação do teste.

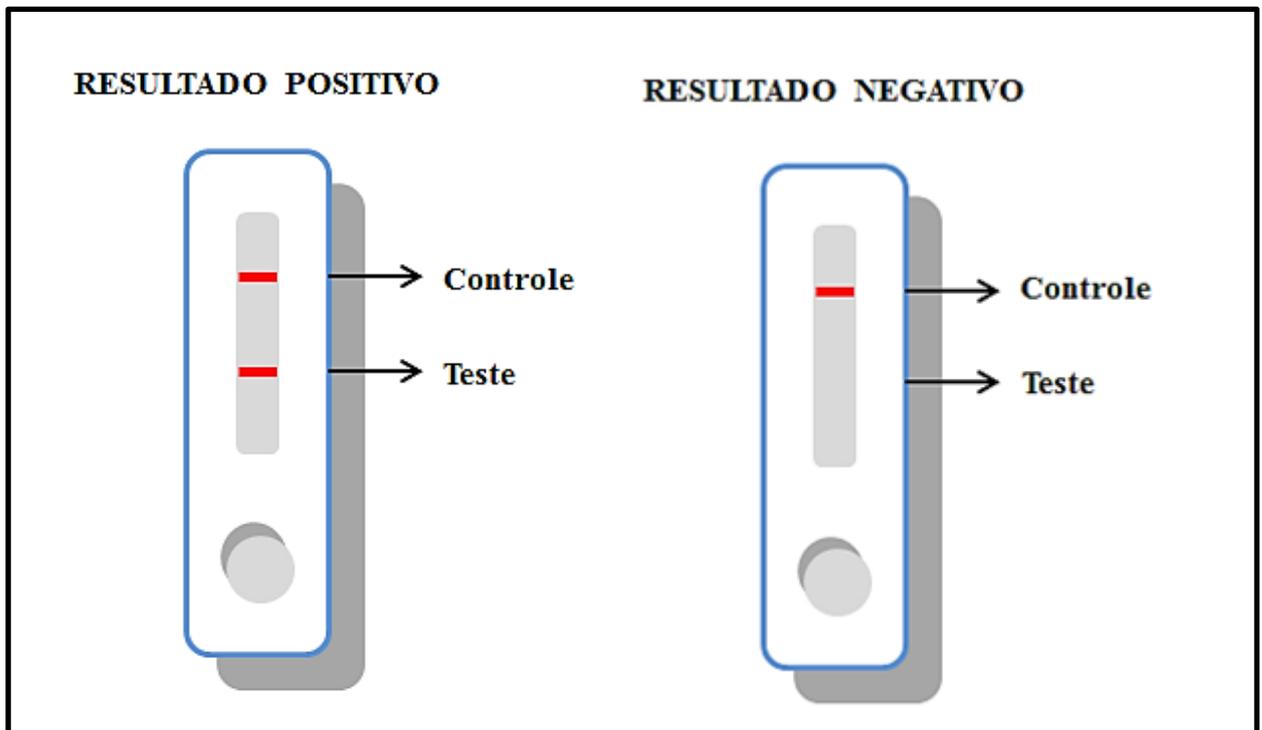
Figura 5: Desenho esquemático do POC-CCA.



Fonte: autora.

A amostra é adicionada ao poço (área da amostra) e migra ao longo da fita de nitrocelulose por capilaridade, percorrendo o cassete, onde o complexo antígeno-anticorpo se liga ao anticorpo monoclonal imobilizado na banda do teste. Para validação do teste, a linha C deve apresentar uma banda de cor avermelhada. Caso a banda não apareça, o teste é considerado inválido e deve ser repetido. Nos casos de testes positivos, o teste apresentará duas bandas avermelhadas: uma na linha C e outra na linha T. Os testes validados são, então, classificados como positivo ou negativo (Figura 6), sendo possível a categorização da intensidade de infecção em fraca ou forte, conforme intensidade da reação.

Figura 6: Desenho esquemático do POC-CCA, evidenciando as reações em testes positivo e negativo.



Fonte: autora.

Sendo considerado um método menos constrangedor do que os métodos coproscópicos, o POC-CCA apresenta diversas vantagens: facilidade de execução, economia de custos e diagnóstico rápido com resultados disponíveis em 20 minutos (BROOKER et al, 2005; RICHARDS et al, 2006). O teste tem apresentado uma satisfatória captura de antígeno, principalmente em pacientes com alta e moderada infecções (ADRIKO et al, 2014).

1.5.3 Métodos Moleculares

Desde o seu surgimento, em 1985 (Saiki et al, 1985), a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem se apresentado como uma importante ferramenta para diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Sua importância se acentuou, principalmente, em casos de infecções leves, nas quais uma técnica com alto grau de sensibilidade e especificidade é necessária para um diagnóstico preciso. A PCR permite amplificação de sequências de DNA ou RNA de agentes infecciosos, copiando-as em larga escala e de maneira específica.

A amplificação gera produtos em progressão geométrica, de modo a produzir mais de um milhão de cópias do DNA alvo. Isso permite que, a partir de uma quantidade mínima de DNA alvo, possam ser geradas grandes quantidades de sequências amplificadas (TAYLOR et al, 1993; MELO, 2006).

A possibilidade de amplificação e detecção de ácidos nucleicos levou a mudanças nos métodos laboratoriais convencionais baseados em expressão fenotípica de antígenos ou produtos bioquímicos (GOMES et al, 2006), confirmando o valor dos métodos moleculares para a análise genética e diagnóstico de várias doenças infecciosas (ABATH et al, 2006).

Os estudos moleculares são responsáveis por grande parte dos avanços da pesquisa em esquistossomose. O prognóstico para as descobertas através desses métodos é promissor, sendo as limitações, principalmente, de caráter técnico (WILSON, 2006). Os estudos genômicos e pós-genômicos contribuem enormemente com informações para a descoberta de novos alvos para drogas e vacinas, além de funções imunomoduladoras que podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos agentes anti-esquistossômicos (HOKKE et al., 2007).

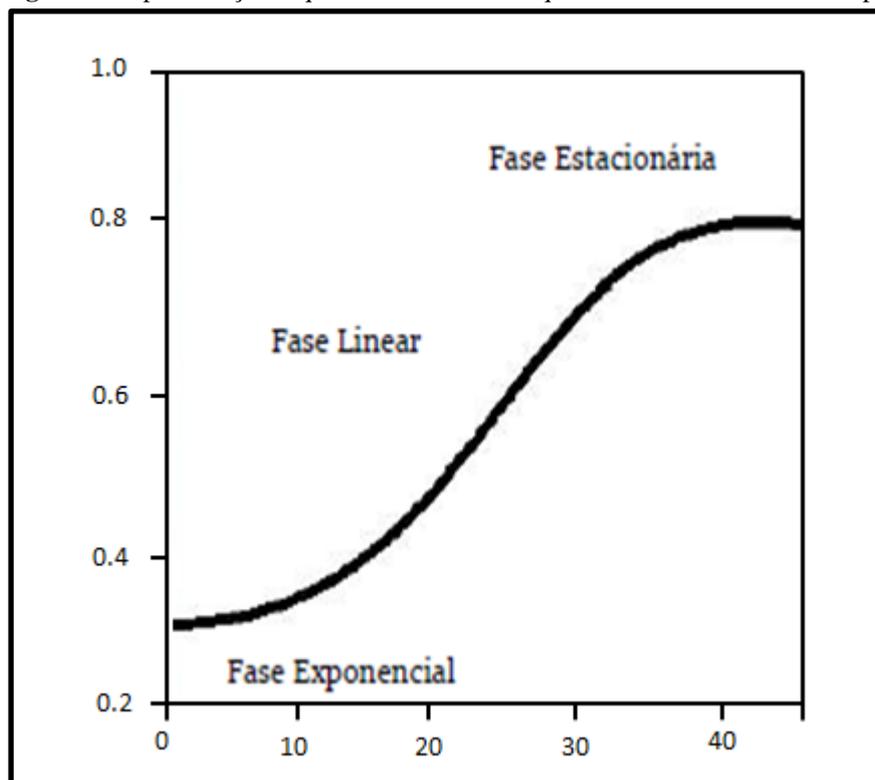
1.5.3.1 PCR em Tempo Real

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo real (rt-PCR) é uma tecnologia de excelência no campo do diagnóstico molecular, que consiste na monitoração da reação e quantificação em tempo real de DNA amplificado a cada ciclo, tendo capacidade de detectar e mensurar quantidades mínimas de ácidos nucleicos em amostras de origens variadas. Higuchi et al (1993) foram pioneiros na análise da cinética da reação de PCR através da construção de

um sistema que detectava produtos de PCR no momento em que eram gerados, utilizando tecnologia de fluorescência.

O produto gerado é monitorado através do acompanhamento da fluorescência de corantes e sondas. Corantes assimétricos de cianina como o SYBR Green, o qual apresenta seletividade, alta sensibilidade por fita dupla de DNA, capacidade de fluorescência quando excitado com luz ultravioleta, além de estabilidade térmica, tornou possível o acompanhamento do processo em tempo real (ZIPPER et al, 2004). O sinal do composto fluorescente é detectado por um *laser* presente no termociclador. Com o acúmulo de produtos gerados na PCR, o sinal emitido cresce exponencialmente (KUBISTA et al, 2005), criando uma curva dividida em três fases: exponencial, crescimento linear e estacionária (Figura 7).

Figura 7: Representação esquemática das 3 fases que constituem a PCR em tempo real.



Fonte: autora.

Considerando a elevada eficiência, a fase exponencial é tida como a melhor para o estudo da reação, dada a relação entre a quantidade de produto amplificado e o DNA inicial. Com a diminuição da disponibilidade de reagentes, verifica-se na fase de crescimento linear

um decréscimo na eficiência e obtém-se produção linear e aumento da fluorescência. Na última fase, a estacionária, devido ao esgotamento dos reagentes utilizados nas fases anteriores, observa-se uma estagnação da reação, formando um platô (COBLE et al, 2004; BUTLER,2005).

Para análise dos resultados, é necessário a definição de alguns conceitos. A *Baseline* consiste no limiar de detecção de fluorescência do aparelho, função linear que serve para eliminar o “ruído de fundo”. O *Threshold* é o ponto de partida a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial, sendo definido arbitrariamente pelo *software* em função da *baseline*. O *Cycle Threshold* (Ct) é o valor relativo aos ciclos em que a curva de amplificação ultrapassa o limiar determinado. O valor de Ct depende do número de moléculas de DNA disponíveis para a amplificação, significando que quanto maior o número de moléculas iniciais, maior será o número de ciclos (Ct) necessários para que seja gerado um maior exponencial do sinal de fluorescência (Rn) (DORAK, 2006; HEID et al, 1996)

Apesar de ser uma modalidade recente na biologia molecular, a rt-PCR apresenta importantes vantagens quando comparada comparada com a PCR convencional: sensibilidade, ao menos, 1000 vezes superior aos ensaios de hibridização e PCR; evidente diminuição do risco de contaminação por não ser necessário a manipulação de produtos de PCR para visualização em corrida eletroforética em gel; e quantificação como uma importante propriedade, principalmente quando utilizada para o diagnóstico de doenças e para caracterização do risco de infectividade dos focos de transmissão e carga parasitária do hospedeiro (ABATH, 2006b; GOMES et al., 2006; WONG; MEDRANO, 2005)

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O método de Kato-Katz é o mais utilizado para diagnóstico da esquistossomose (GRYSEELS, 2012). A técnica apresenta diversas vantagens: baixo custo, possibilidade de ser realizada em um laboratório com infraestrutura básica, não apresentar resultados falso-positivos e fornecimento de informações básicas sobre a prevalência e a intensidade da infecção. Porém, apresenta como limitação a baixa sensibilidade, especialmente em áreas de baixa endemicidade e em infecções com baixa carga parasitária, já que depende diretamente da quantidade de ovos eliminados pelo portador (UTZINGER et al, 2001). Além disso, também compromete a estimativa da prevalência real da doença, é um método laborioso e que necessita do treinamento e da expertise dos profissionais que farão a leitura das lâminas. Essas limitações podem ser, parcialmente, compensadas com a utilização de um maior volume do material fecal ou coleta de mais de uma amostra por pessoa, em dias consecutivos. Entretanto, estas alternativas aumentam os custos operacionais do método parasitológico e dificultam a logística do processo (TELES et al, 2003). Dentro deste contexto, outras metodologias têm se apresentado como alternativas para o diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade, tais como o POC-CCA e o rt-PCR.

O método de imunodiagnóstico de POC-CCA detecta o antígeno circulante específico CCA, uma glicoproteína derivada do epitélio intestinal do parasita (DEELDER et al, 1994). Tal sistema combina o diagnóstico rápido com um menor manuseio das amostras, reduzindo tempo, custo e eventuais erros (OUELLETTE et al, 2009).

Já a técnica molecular baseada na PCR, relatada para o diagnóstico de vários patógenos infectantes, é considerada como ferramenta complementar no diagnóstico da esquistossomose (UTZINGER, 2001). O diagnóstico baseado na técnica de rt-PCR tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade e pode ser utilizada para detecção de DNA de *S. mansoni* nas fezes (PONTES et al, 2002), soro (TEN HOVE et al, 2008) e, recentemente, em plasma (WICHMANN et al, 2009) e urina (SANDOVAL et al, 2006).

Pesquisas visando o aprimoramento de metodologias em uso, em fase de validação ou desenvolvimento, tornam-se vitais, considerando a sensibilidade limitada apresentada pelas técnicas parasitológicas em casos de baixa carga parasitária. O controle da esquistossomose mansônica em áreas endêmicas ou em pequenos grupos populacionais, a prevalência estimada da infecção, o tamanho populacional, a disponibilidade da infraestrutura e recursos e métodos

diagnósticos com alta sensibilidade e alta especificidade são fatores levados em consideração para escolha de um método a ser utilizado, tanto quanto o custo financeiro.

Dessa forma, o presente trabalho pretende avaliar as técnicas diagnósticas propostas pelo estudo, para determinar o potencial de aplicação de cada uma delas, baseado na premissa de que todo método diagnóstico deve ser submetido à padronização e validação, para que cumpra satisfatoriamente a sua função essencial de auxiliar na orientação, planejamento e desenvolvimento de ações e controle da esquistossomose.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.1.1 Avaliar o desempenho dos métodos de POC-CCA e PCR em tempo real para diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar indivíduos positivos e negativos para *Schistosoma mansoni* numa área de baixa endemicidade através da utilização do método parasitológico de Kato-Katz.

3.2.2 Determinar a acurácia do POC-CCA e do PCR em tempo real frente ao padrão-ouro Kato-Katz.

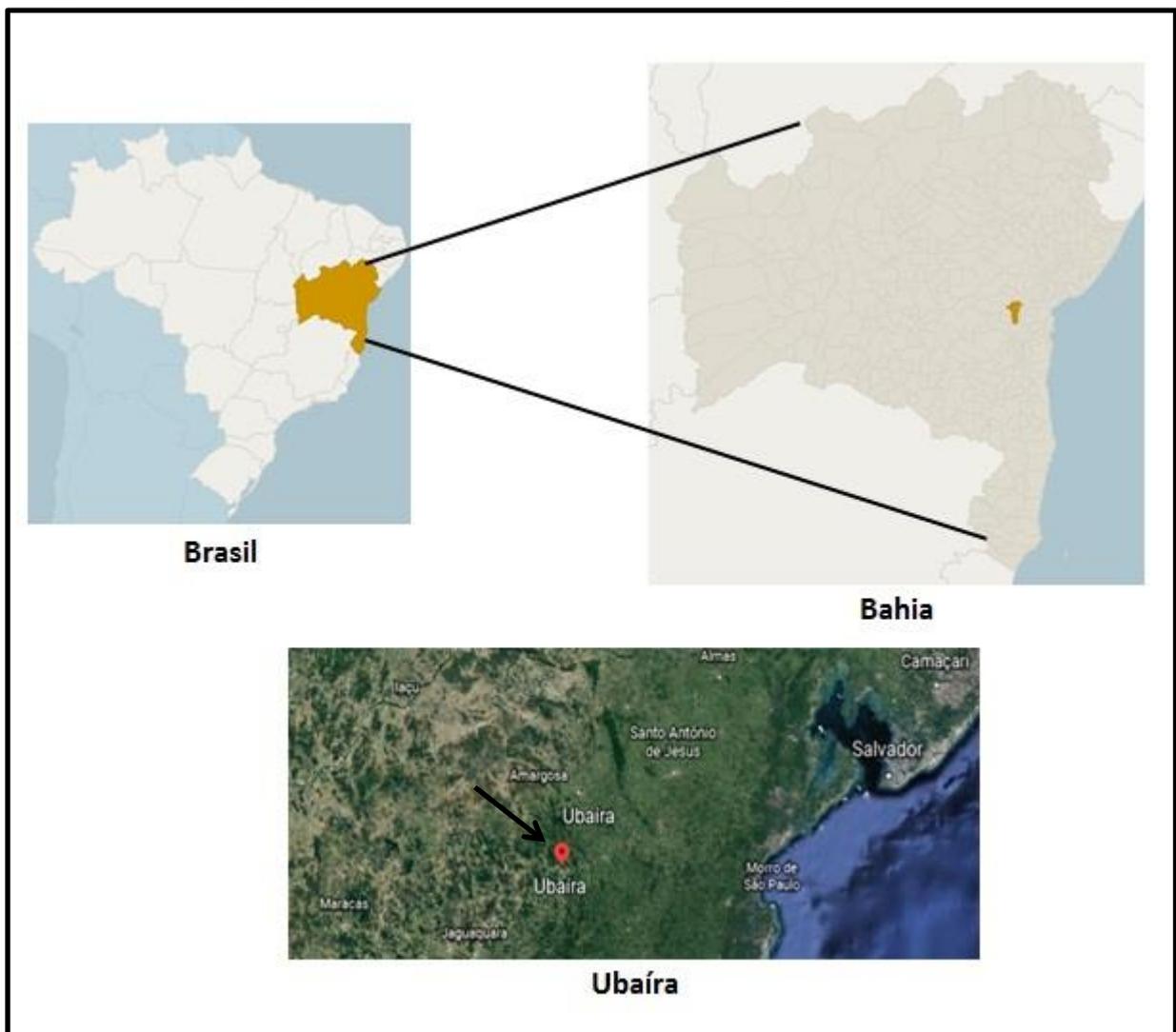
3.2.3 Comparar o desempenho dos métodos POC-CCA e PCR em tempo real para diagnóstico da esquistossomose mansônica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O município de Ubaíra ($13^{\circ}15'22''\text{S} / 39^{\circ}39'46''\text{W}$) está localizado no Vale do Jiquiriçá, região Centro-leste do estado da Bahia, no Nordeste do Brasil (Figura 8). O município apresenta área territorial de 659.138 km² e possui 19.914 habitantes (IBGE, 2010). A agricultura é a principal atividade econômica do município, com as lavouras de cacau, café, mandioca e cereal e cultivo de hortifrutigranjeiro. A pecuária também vem se desenvolvendo, tornando-se uma importante atividade econômica da região.

Figura 8: Localização geográfica da área de estudo, destacando o município de Ubaíra.



Fonte: autora.

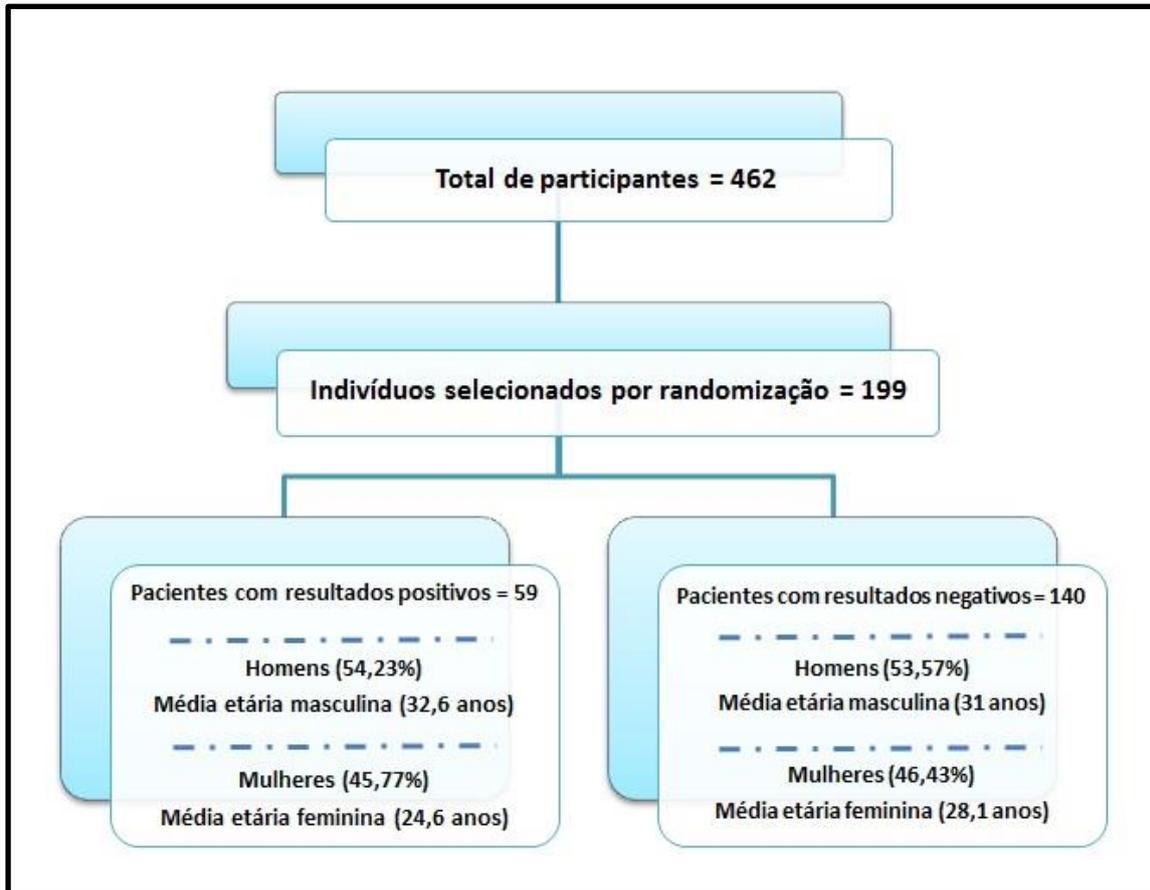
O estudo foi realizado em uma comunidade desse município: Jenipapo. Composta por vales íngremes, rios e colinas, a comunidade de Jenipapo tem como principal atividade econômica a criação de gado e outros animais (BLANTON et al, 2011). Em Jenipapo, existe uma clínica do Programa de Saúde da Família, com uma equipe composta por um médico, um dentista e uma enfermeira. Também possui escolas primárias e secundárias, frequentadas pelos habitantes da comunidade e de comunidades próximas.

Em 2009, foi iniciado, no município de Ubaíra, o projeto “A Influência da Ecologia Local nas Doenças Transmitidas pela Água”, no qual se buscava investigar casos de diarreia e esquistossomose. Foi realizado um censo para todos os agregados familiares no início do estudo e todos os residentes de Ubaíra, com exceção das crianças menores de 1 (um) ano de idade, foram convidados a participar do projeto. Os participantes ou responsáveis responderam um breve questionário sobre características demográficas e tratamento prévio para parasitas e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do projeto. Foi solicitado aos participantes três amostras de fezes em dias consecutivos, dentro da mesma semana, para realização do Kato-Katz. Dessa forma, constatou-se que a comunidade de Jenipapo apresentava alta prevalência de infecção por *S. mansoni*. O projeto continua sendo desenvolvido na região, com acompanhamento e tratamento dos participantes, os quais totalizam 462 pessoas.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para o presente estudo, o qual se define como ensaio clínico de fase II, dentre os 462 participantes do projeto, foram selecionados 199 indivíduos, por randomização. Os indivíduos selecionados apresentaram resultados negativos e positivos para *S. mansoni*, determinado pelo método parasitológico de Kato-Katz, numa proporção de 2:1, respectivamente. Dentre os 199 indivíduos participantes, 53,9% são homens e 46,1% são mulheres. A média de faixa etária dos participantes foi de 31,8 para os homens e de 26,3 para as mulheres. As taxas se mantêm muito semelhantes tanto nos casos de pacientes com resultados positivos como nos de resultados negativos (Figura 9).

Figura 9: Fluxograma das etapas envolvidas na seleção da população de estudo.



Fonte: autora.

Critérios de inclusão: foram incluídos no estudo os moradores da comunidade supracitada, selecionados para o estudo, com idade superior a 1 ano de idade, de ambos os sexos e que tenham fornecido 4 amostras de fezes e uma amostra de urina.

Critérios de não inclusão: não foram incluídos no estudo os indivíduos que não residem na comunidade supracitada, menores de 1 ano de idade e que não tenham entregado nenhuma das amostras requisitadas ou apenas um dos dois tipos de amostras solicitadas (fezes e urina).

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, de Salvador, Bahia. Os indivíduos selecionados consentiram em participar do estudo,

assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). Os menores de 18 anos tiveram sua participação consentida pelos pais ou responsáveis, os quais também assinaram o termo. O TCLE foi escrito em linguagem simples e de fácil entendimento, com descrições resumidas da metodologia da pesquisa e os riscos e benefícios provenientes desse estudo.

4.4 COLETA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para realização do Kato-Katz, foram coletadas 3 amostras de fezes, em dias consecutivos, dentro da mesma semana. Para realização do POC-CCA e PCR em tempo real, foram coletadas mais 1 (uma) amostra de fezes e 1 (uma) amostra de urina de cada participante, em frascos coletores estéreis, recolhidas em Ubaíra. Todos os recipientes utilizados para armazenamento das amostras foram devidamente identificados no momento da entrega, com as iniciais do nome completo e número de identificação, conforme ficha de cadastro elaborada pelo projeto, para cada indivíduo participante. Posteriormente, os recipientes também foram etiquetados com código de barras. As amostras de urina foram aliquotadas em tubos de falcon de 15 mL. Dos 199 indivíduos selecionados, 121 participantes entregaram as amostras solicitadas, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão do estudo. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor, com placas de gelo artificial reutilizáveis, e transportadas para o Instituto Gonçalo Moniz, onde foram armazenadas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o Laboratório de Parasitologia Clínica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, onde foram igualmente armazenadas em freezer a -20°C.

4.5 DIAGNÓSTICO

4.5.1 Método Parasitológico de Kato-Katz

O exame parasitológico de fezes através do método de Kato-Katz foi realizado em todas as três amostras de fezes, com uma lâmina para cada amostra. Utilizou-se o Helm-Test®, produzido por Biomanguinhos / FIOCRUZ. A tela de nylon (com abertura de 150 µm) contida no kit foi colocada sobre as fezes, pressionando-as com o auxílio de uma espátula. Em seguida, as fezes filtradas foram transferidas para o orifício do cartão já posicionado sobre a lâmina. Após preencher completamente o orifício, o cartão foi retirado, deixando as fezes

sobre a lâmina de vidro. As fezes foram cobertas com uma lamínula, uma gota de verde de malaquita foi adicionada e a lâmina foi invertida e pressionada contra o papel, para formação de uma camada delgada entre a lâmina e a lamínula. As lâminas foram confeccionadas e analisadas no laboratório montado pela equipe do projeto, no município de Ubaíra, num microscópio óptico, usando objetiva de 10x. As preparações podem ser examinadas após duas horas ou até três meses, se devidamente acondicionadas, sem prejuízo dos resultados.

Para a análise quantitativa, realizou-se a contagem de todos os ovos presentes na lâmina e multiplicou-se pelo fator 24. Cada lâmina possui 42 mg de fezes e, ao multiplicar-se pelo fator 24, obtém-se o valor aproximado de 1 g de fezes ($42 \text{ mg} \times 24 = 1,008 \text{ g}$). Com isso, o número de ovos (ou média de ovos) por lâminas multiplicado por 24 resulta no número de ovos por grama de fezes (OPG). Para determinação da carga parasitária, calculou-se a média do número de ovos obtidos nas três lâminas analisadas, de cada participante.

4.5.2 Método Imunológico de POC-CCA

Para realização do teste imunológico de POC-CCA, utilizou-se o kit da Eco Teste Diagnostica LTDA (lotes 201609007 e 161129179) (Figura 10). Cada kit contém 10 dispositivos de teste, 10 pipetas plásticas descartáveis e 1 folheto de instrução de uso. Os testes foram feitos conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, foi feito um teste piloto utilizando 8 amostras (6 amostras positivas e 2 amostras negativas). Posteriormente, todas as amostras foram testadas duas vezes, num intervalo de 6 meses.

Figura 10: Testes rápido de POC-CCA.



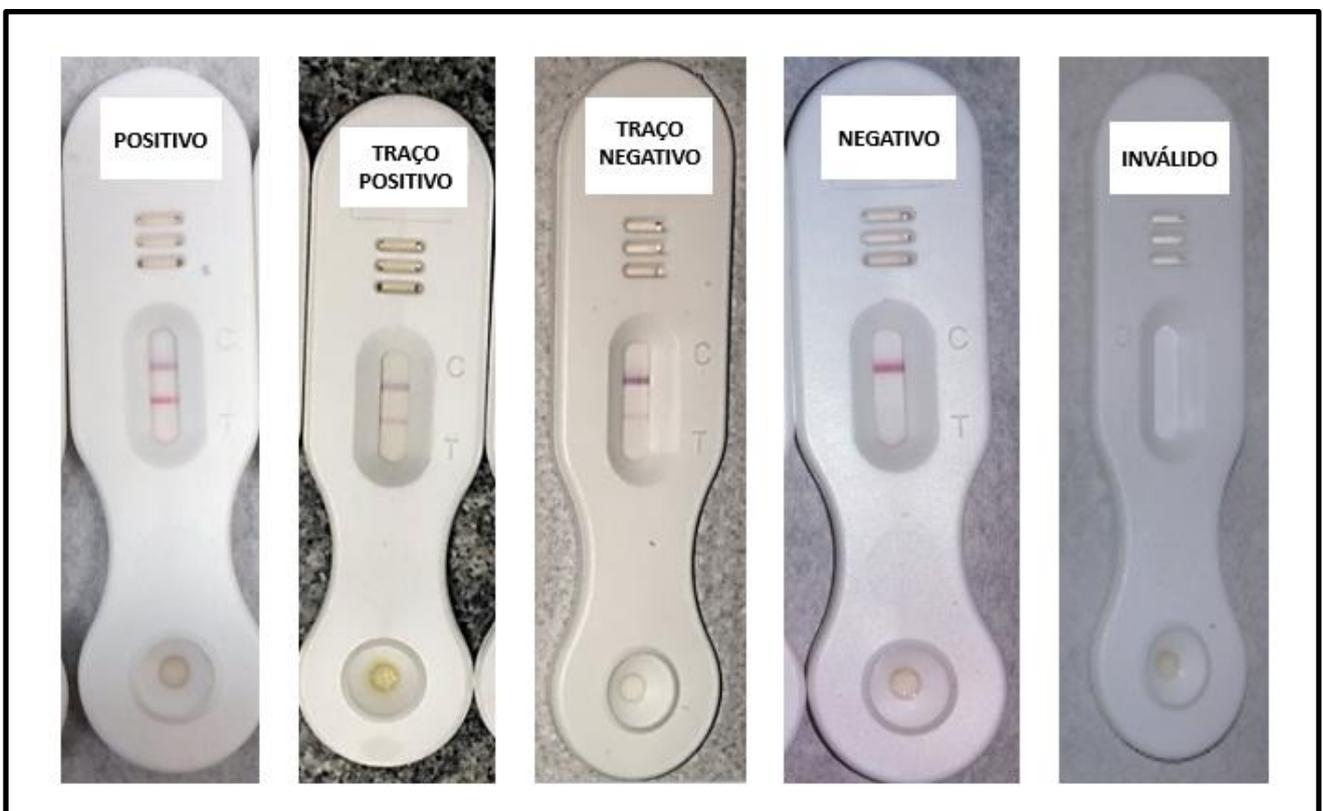
Fonte: autora.

As amostras de urina foram homogeneizadas 5 vezes por inversão. Depois, retiraram-se três gotas, com auxílio da pipeta plástica descartável, as quais foram adicionadas ao poço circular do dispositivo de teste. A urina foi absorvida e distribuída por toda extensão da fita de nitrocelulose, presente no interior do dispositivo, o que pode ser observado através da abertura retangular na porção central do dispositivo. Após 20 minutos, realizou-se a leitura do teste rápido, sendo analisado por dois observadores.

Os resultados obtidos foram classificados da seguinte forma: a) inválido – linha de controle ausente, independentemente do resultado apresentado na linha teste; b) positivo – linha de controle com presença de banda avermelhada e linha de teste com presença de banda fortemente avermelhada; c) traço positivo: linha de controle com presença de banda avermelhada e linha de teste com presença de banda avermelhada de média intensidade; d) negativo – linha de controle com presença de banda avermelhada e linha de teste com ausência de banda; e) traço negativo – linha de controle com presença de banda avermelhada e linha de

teste com presença de banda fracamente avermelhada (Figura 11). Os testes que apresentaram resultado inválido foram repetidos. Para avaliação dos resultados, foram considerados dois critérios: a classificação de resultados determinada pelo fabricante, onde todos os resultados traço devem ser considerados como resultados positivos; e a classificação de resultados determinada pelo estudo, onde os resultados traço positivos foram considerados como resultados positivos e os resultados traço negativos foram considerados como negativos.

Figura 11: Resultados dos testes rápidos de urina, de acordo com o padrão de bandas.



Fonte: autora.

4.5.3 Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Clínica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. A técnica foi realizada individualmente, a partir das amostras de fezes, seguindo o protocolo padrão do Kit QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

4.5.4 Método Molecular de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Os primers utilizados foram o Schfo 11 (5'- CGATCAGGACCAGTGTTCAGC -3') e Schre (5'- GACAGGTCAACAAGACGAACTCG -3'), os quais são específicos para o gene que codifica a subunidade ribossomal 18S rRNA do *S. mansoni*. A seleção desse gene foi motivada por sua presença em cerca de 100 cópias no genoma do parasito (GOMES et al, 2006).

Todas as reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), com as seguintes configurações: etapa inicial de desnaturação a 50°C por 2 minutos; 40 ciclos de amplificação (95°C por 2 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos) (adaptado de GOMES et al, 2006). Foram utilizados 8,5µl de H₂O, 12,5µl de SYBR Green, 1µl de primer, 1µl de ROX e 2µl do DNA extraído das amostras de fezes de cada participante, obtendo-se um volume final de 25µl. Em cada reação, utilizou-se um controle negativo em duplicata e todas as amostras também estavam em duplicata. Uma curva padrão foi elaborada a partir de uma amostra de *S. mansoni* proveniente de amostras de fezes. Todos os experimentos foram realizados em cabine de fluxo laminar, previamente irradiada com luz ultravioleta e empregando somente produtos descartáveis estéreis, incluindo ponteiros com barreiras.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi formulado um banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010. Os parâmetros avaliados e as análises comparativas para avaliar o desempenho das técnicas diagnósticas (sensibilidade, especificidade, acurácia e índice Kappa) foram também calculados usando o Microsoft Office Excel 2010. Os valores dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) para sensibilidade, especificidade e acurácia foram calculados conforme as seguintes fórmulas:

$$IC95\% = \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{Sen \times (1 - Sen)}{ND}} \quad e \quad IC95\% = \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{Esp \times (1 - Esp)}{NS}}$$

Onde:

ND = número de doentes

NS = número de sadios

O índice Kappa de Cohen foi utilizado para determinar o grau de concordância entre os observadores do método imunológico de POC-CCA e o grau de concordância entre os métodos diagnósticos. Esse índice varia de 0 a 1 e seus resultados foram interpretados dentro dos seguintes parâmetros: a) nenhum acordo – quando o índice for menor do que 0,01; b) ruim – quando o índice estiver entre 0,02 e 0,20; c) fraco – quando o índice estiver entre 0,21 e 0,40; d) moderado – quando o índice estiver entre 0,41 e 0,60; e) bom – quando o índice estiver entre 0,61 e 0,80; f) excelente – quando maior que 0,81 (LANDIS e KOCH, 1977).

4.6.1 Intensidade de Infecção

A intensidade de infecção foi determinada pelo número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes (opg). Calculou-se a média da soma de ovos encontrados nas 3 lâminas de cada indivíduo. De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde, existem três níveis de intensidade de infecção: (1) baixa intensidade: 1-100 opg, (2) moderada ou média: 101-400 opg e (3) alta: > 401 opg (OMS, 1993). A carga parasitária no método de POC-CCA foi classificada como fraca ou forte, de acordo com a intensidade da reação.

4.6.2 Padrão Ouro e Taxa de Positividade

O padrão ouro do estudo foi o método parasitológico de Kato-Katz.

A taxa de positividade indica a percentagem de indivíduos positivos diagnosticados por cada método em relação ao total de indivíduos positivos diagnosticados pelo padrão ouro. Portanto, essa taxa foi obtida a partir do número de indivíduos positivos, diagnosticados pelos

métodos de POC-CCA e rt-PCR, dividido pelo total de indivíduos positivos identificados pelo Kato-Katz.

4.6.3 Parâmetros Utilizados na Avaliação de Desempenho Diagnóstico das Técnicas

Os parâmetros estatísticos utilizados na validação dos métodos diagnósticos foram sensibilidade, especificidade, acurácia e índice Kappa.

Sensibilidade é a percentagem de infectados ou doentes corretamente diagnosticados por um teste positivo. A sensibilidade corresponde à proporção de verdadeiros positivos do teste: $a/(a+c)$ (Tabela 1).

Especificidade é a percentagem de não doentes corretamente identificados por um teste negativo. A especificidade corresponde à proporção de verdadeiros negativos do teste: $d/(b+d)$ (Tabela 1).

Acurácia refere-se ao grau em que o teste ou uma estimativa baseada em um teste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo avaliado. Indica o grau de concordância que há entre o resultado obtido e o dito valor verdadeiro (Tabela 1).

O **índice Kappa** de Cohen mede a concordância entre avaliadores para itens qualitativos. É uma medida mais robusta do que o cálculo percentual de concordância, já que leva em consideração a possibilidade de a concordância ter ocorrido por acaso (Tabela 1).

Os métodos diagnósticos podem ainda apresentar quatro parâmetros a serem analisados, sendo eles: verdadeiro positivo, falso positivo, verdadeiro negativo e falso negativo.

Verdadeiro positivo (VP) é o indivíduo doente e diagnosticado como positivo por um teste.

Falso positivo (FP) é o indivíduo saudável e diagnosticado como positivo por um teste.

Verdadeiro negativo (VN) é o indivíduo saudável e diagnosticado como negativo por um teste.

Falso negativo (FN) é o indivíduo doente e diagnosticado como negativo por um teste.

Tabela 1: Tabela 2x2 e fórmulas de cálculo dos principais parâmetros analisados no estudo.

Teste Diagnóstico	Padrão Ouro		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	VP (a)	FP (b)	(a + b)
Negativo	FN (c)	VN (d)	(c + d)
Total	(a + c)	(b + d)	(a+ b + c + d)

Especificidade = $\frac{d}{b + d}$

Sensibilidade = $\frac{a}{a + c}$

Acurácia = $\frac{(VP + VN)}{(VP + VN + FP + FN)}$

Índice Kappa = $\frac{Po^* - Pe^{**}}{1 - Pe}$

*Po = número de concordâncias observadas

**Pe = número de concordâncias esperadas

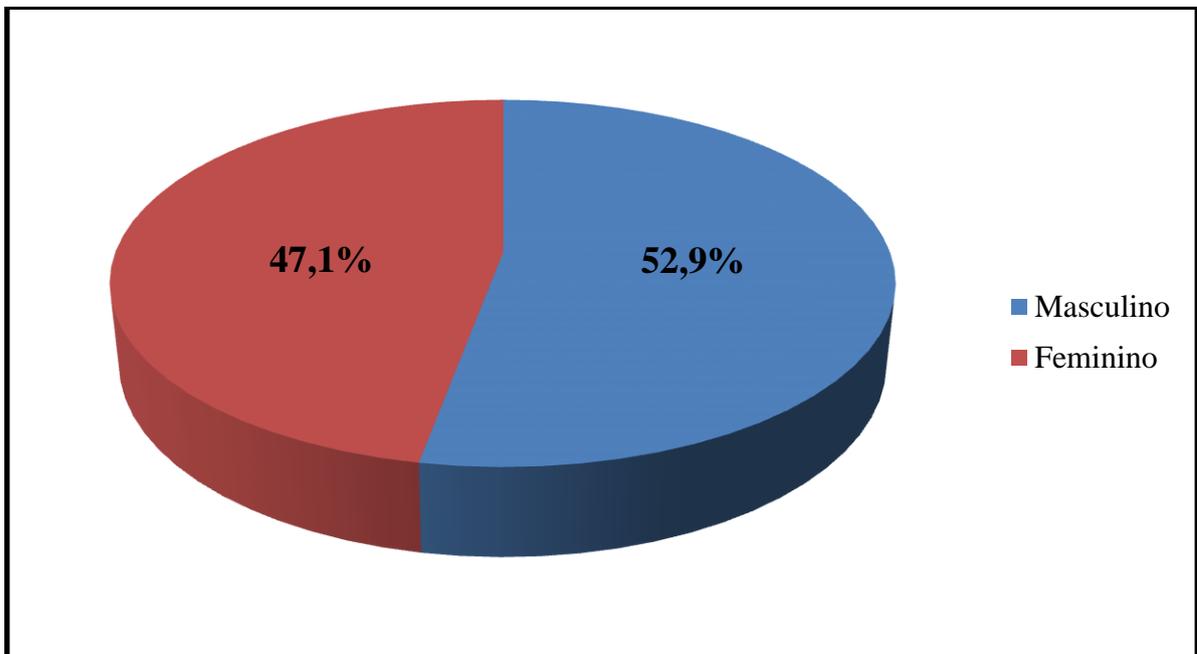
Fonte: autora.

5. RESULTADOS

5.1 PERFIL POPULACIONAL

A partir de dados sobre idade e gênero, obtidos durante o cadastramento para participação no estudo, foi traçado um perfil epidemiológico. Dos 121 participantes, 57 eram mulheres e 64 eram homens (Figura 12). Entre os indivíduos diagnosticados como positivos pelo padrão ouro, a maioria era do sexo masculino (56,2%).

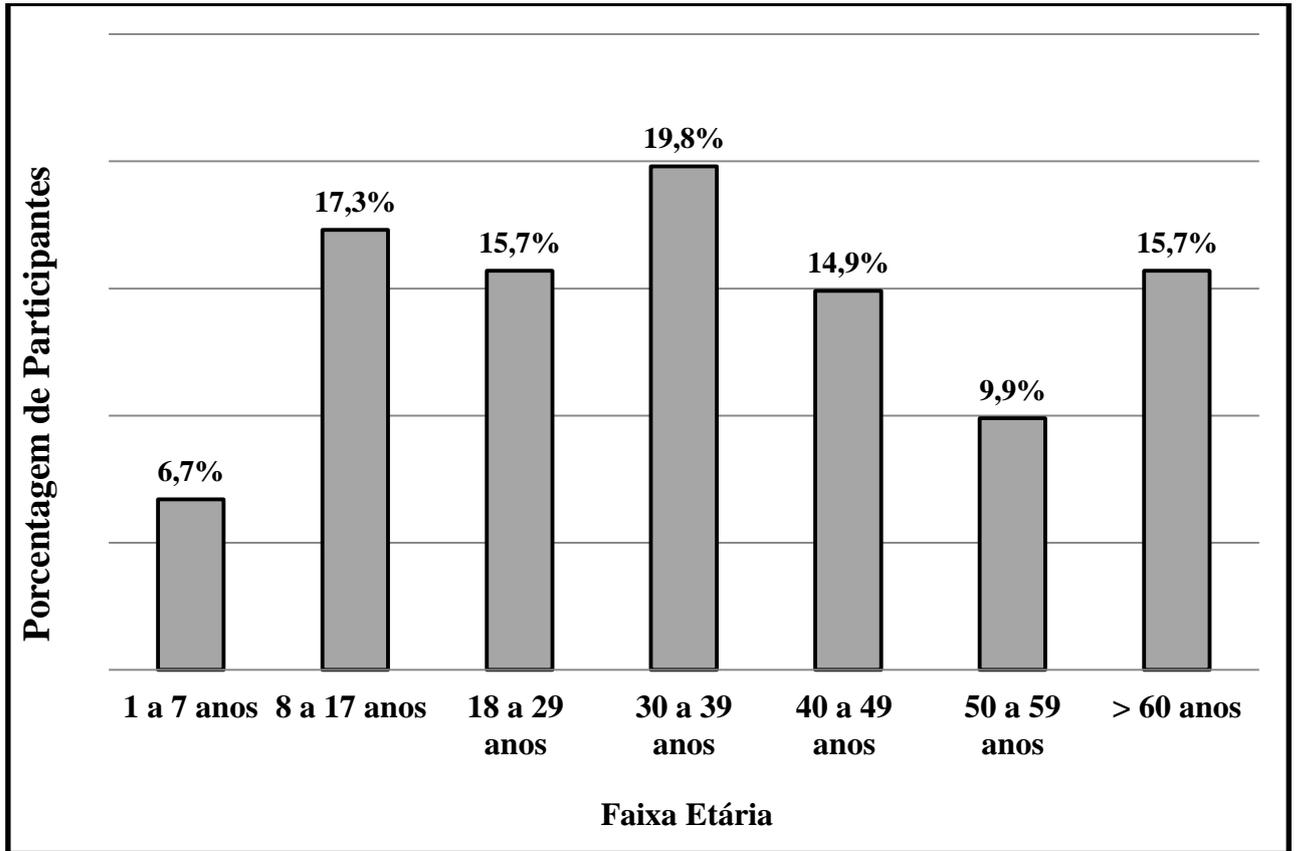
Figura 12: Perfil populacional de acordo com a porcentagem de gênero dos participantes.



Fonte: autora.

A média etária dos participantes foi de 34,8 anos. A média etária dos participantes do gênero masculino foi de 33,7 e a média etária dos participantes do gênero feminino foi de 36 anos. A maior porcentagem de participantes estava na faixa etária de 30 a 39 anos (19,8%), seguida dos indivíduos em idade escolar, de 8 a 17 anos (17,3%). A faixa etária com menor porcentagem de participantes foi a de 1 a 7 anos, correspondendo a 6,7% (Figura 13).

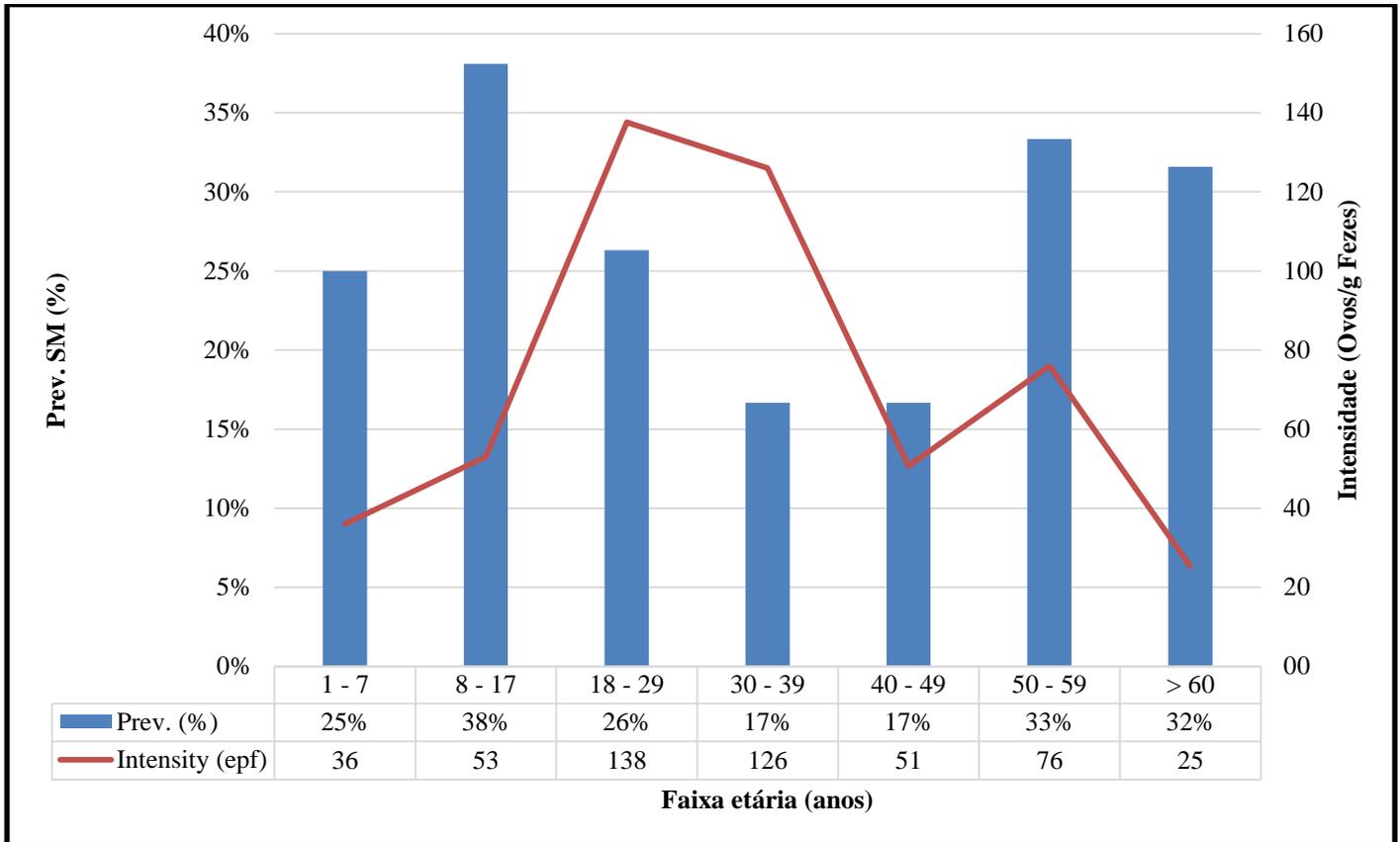
Figura 13: Perfil populacional de acordo com a faixa etária dos participantes.



Fonte: autora

O método de Kato-Katz identificou 32 indivíduos positivos dentre o total de 121 participantes. Dos 32 indivíduos positivos, 14 (43,7%) eram do gênero feminino e 18 (56,3%) do gênero masculino. A faixa etária com maior prevalência da doença foi a de 8 a 17 anos (38%) seguida das faixas etárias acima de 50 a 59 anos (33%) e acima de 60 anos (32%) (Figura 14). As categorias etárias de 30 a 39 anos e 40 a 49 anos apresentaram as menores taxas de prevalência (ambas 17%). A maior intensidade de infecção foi identificada na faixa etária de 18 a 29 anos, seguida da faixa etária de 30 a 39 anos. A menor intensidade de infecção identificou-se nos indivíduos acima de 60 anos.

Figura 14: Prevalência da esquistossomose relacionada à faixa etária e intensidade de infecção dos participantes do estudo.

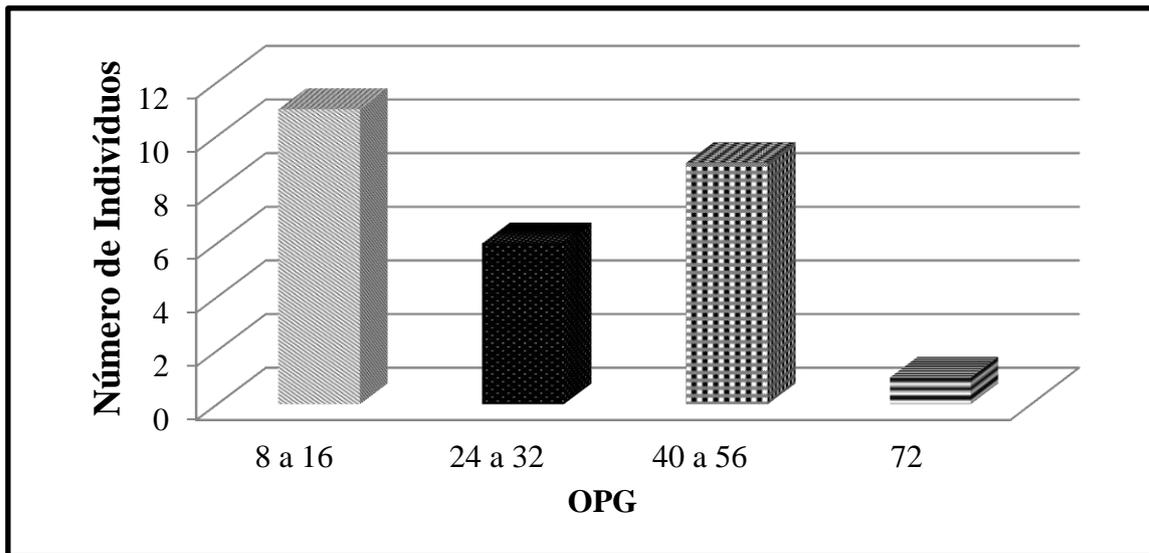


Fonte: autora.

5.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG)

A intensidade de infecção por *S. mansoni* foi estimada a partir da média do número de ovos eliminados por grama de fezes, obtida da leitura de três lâminas de uma mesma amostra. De acordo com a classificação de WHO (2002), com a técnica de Kato-Katz foram diagnosticados 32 indivíduos: 27 com baixa carga parasitária, 3 com média carga parasitária e 2 com alta carga parasitária. Os valores de OPG variam de 8 a 584, com média de 73,2 OPG, o que corresponde a infecções de baixa carga parasitária.

Ao se observar os indivíduos com baixa carga parasitária, verificou-se que 11 indivíduos apresentaram 8 a 16 OPG, 6 apresentaram 24 a 32 OPG, 9 apresentaram 40 a 56 OPG e 1 apresentou 72 OPG (Figura 15).

Figura 15: Distribuição do número de indivíduos com baixa carga parasitária.

Fonte: autora.

Dentre os 32 indivíduos positivos, 2 indivíduos apresentaram alta carga parasitária (424 e 584 OPG) e 3 indivíduos apresentaram média carga parasitária (128, 192 e 272 OPG).

5.3 MÉTODO DE POC-CCA

No total, o método identificou 22 resultados positivos, 3 resultados traço positivos, 63 negativos e 33 resultados traço negativos. Os resultados traço totalizaram 36, representando 29,7% das amostras totais. Seguindo-se a interpretação de resultados do fabricante, todos os resultados traço devem ser considerados como positivos. Considerando esse critério de análise, os resultados obtidos pelo POC-CCA foram 58 amostras positivas e 63 amostras negativas (Tabela 2).

Tabela 2: Tabela de prevalência obtida pela técnica de POC-CCA, considerando critério do fabricante.

Resultado	POC-CCA	
	N	%
Positivo	58	47,9
Negativo	63	52,1
Total	121	100,0

Fonte: autora

Para avaliar o desempenho do teste, utilizamos a interpretação a partir das diferentes intensidades apresentadas pela banda teste do POC-CCA. O critério proposto pelo estudo considera os resultados traço positivos como positivos e os resultados negativos como negativos. Para esta análise acerca dos casos traço, o nível de concordância entre os resultados obtidos entre os observadores foi avaliado pelo índice Kappa. Obteve-se $k = 0,94$, o que indica uma forte concordância inter-observadores (LANDIS e KOCH, 1977). Nos casos discordantes entre os observadores, considerou-se os resultados obtidos pelo observador 1. Sendo assim, obtiveram-se 25 resultados positivos e 96 resultados negativos (Tabela 3).

Tabela 3: Tabela de resultados obtidos pela técnica de POC-CCA, considerando critério do estudo.

Resultado	POC-CCA	
	N	%
Positivo	25	20,7
Negativo	96	79,3
Total	121	100

Fonte: autora

Considerando o critério de interpretação do fabricante do teste, a sensibilidade obtida pelo POC-CCA foi de 65,6% e a especificidade de 58,4%. A acurácia foi de 60,3%. Também pode-se observar que o POC-CCA apresentou 37 resultados falso-positivos e 11 resultados falso-negativos (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação do POC-CCA para diagnóstico de infecção por *Schistosoma mansoni*, considerando o critério de interpretação do fabricante.

		Kato-Katz			TOTAL		
		Positivo	Negativo				
POC-CCA	Positivo	a	21	b	37	a+b	58
	Negativo	c	11	d	52	c+d	63
	TOTAL	a+c	32	b+d	89	N	121
Sensibilidade (IC)	a/(a+c)	21 / 32 = 65,6% (48,3-79,6%)					
Especificidade (IC)	d/(b+d)	52 / 89 = 58,4% (48,0-68,1%)					
Acurácia (IC)	a+d/N	(21+52) / 121 = 60,3% (51,9-68,6%)					

Fonte: autora.

Através do critério de interpretação proposto pelo presente estudo, a sensibilidade foi de 43,8% e a especificidade foi de 87,6%. A acurácia foi 76% (Tabela 5). Dentre os 14 indivíduos positivos, 10 apresentaram reação de fraca intensidade e 4 indivíduos apresentaram reação de forte intensidade. Os quatro indivíduos que apresentaram fortes reações tinham alta e média cargas parasitárias no método de Kato-Katz (2 com média carga parasitária e 2 com alta carga parasitária). Os demais tinham baixa carga parasitária, de acordo com o método padrão ouro (8 a 56 OPG). Dentre os 18 resultados classificados como falso-negativos pelo método de POC-CCA, 17 apresentaram baixas cargas parasitárias (média de 24 OPG) no método de Kato-Katz e 1 apresentou média carga parasitária (128 OPG).

Tabela 5: Avaliação do POC-CCA para diagnóstico de infecção por *Schistosoma mansoni*, considerando o critério proposto pelo estudo.

		Kato-Katz			TOTAL		
		Positivo	Negativo				
POC-CCA	Positivo	a	14	b	11	a+b	25
	Negativo	c	18	d	78	c+d	96
	TOTAL	a+c	32	b+d	89	N	121
Sensibilidade (IC)	a/(a+c)	14 / 32 = 43,8% (28,2-60,7%)					
Especificidade (IC)	d/(b+d)	78 / 89 = 87,6% (79,2-93,0%)					
Acurácia (IC)	a+d/N	(14+78) / 121 = 76,0% (67,7-82,8%)					

Fonte: autora.

5.4 MÉTODO DE rt-PCR

No total, o rt-PCR identificou 18 resultados positivos e 103 resultados negativos (Tabela 6).

Tabela 6: Tabela de resultados obtidos pela técnica de rt-PCR.

Resultado	rt-PCR	
	N	%
Negativo	103	85,1
Positivo	18	14,9
Total	121	100

Fonte: autora.

A sensibilidade foi de 56,2% e a especificidade de 100%. A acurácia foi de 88,4%. Não foi identificado nenhum resultado falso-positivo e 14 resultados falso-negativos foram encontrados (Tabela 7). Todos os resultados falso-negativos encontrados pelo rt-PCR apresentaram baixas cargas parasitárias no Kato-Katz.

Tabela 7: Avaliação do rt-PCR para diagnóstico de infecção por *Schistosoma mansoni*.

		Kato-Katz			TOTAL		
		Positivo	Negativo				
rt-PCR	Positivo	a	18	b	0	a+b	18
	Negativo	c	14	d	89	c+d	103
	TOTAL	a+c	32	b+d	89	N	121
Sensibilidade (IC)	a/(a+c)	18 / 32 = 56,2% (39,3-71,8%)					
Especificidade (IC)	d/(b+d)	89 / 89 = 100% (95,9-100%)					
Acurácia (IC)	a+d/N	(18+89) / 121 = 88,4% (81,5-93,0%)					

Fonte: autora.

Entre os 18 indivíduos positivos identificados pelo RT-PCR, 2 indivíduos apresentaram alta carga parasitária e 2 indivíduos apresentaram média carga parasitária, de acordo com o método de Kato-Katz. Os demais tinham baixa carga parasitária.

5.5 AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE POC-CCA E rt-PCR

Considerando o critério de interpretação do fabricante, onde todos os resultados traço positivos e traço negativos devem ser considerados como positivos, a sensibilidade obtida pelos dois métodos comparados foi de 66,7% e a especificidade de 55,3%, tendo como referência o método de rt-PCR. A acurácia foi de 57% (Tabela 8). Foram identificados 46 resultados falso-negativos e 6 resultados falso-positivos.

Tabela 8: Avaliação do rt-PCR x POC-CCA para diagnóstico de infecção por *Schistosoma mansoni*, considerando o critério proposto pelo fabricante.

		rt-PCR					TOTAL
		Positivo		Negativo			
POC-CCA	Positivo	a	12	b	46	a+b	58
	Negativo	c	6	d	57	c+d	63
TOTAL		a+c	18	b+d	103	N	121
Sensibilidade (IC)		a/(a+c)					12 / 18 = 66,7% (43,7-83,7%)
Especificidade (IC)		d/(b+d)					57 / 103 = 55,3% (45,7-64,6%)
Acurácia (IC)		a+d/N					(12+57) / 121 = 57,0% (48,1-65,5%)

Fonte: autora.

Considerando o critério de interpretação proposto pelo estudo, onde todos os resultados traço positivos e traço negativos devem ser considerados como positivos, a sensibilidade obtida pelos dois métodos comparados foi de 55,5% e a especificidade de 85,4%, tendo como referência o método de rt-PCR. A acurácia foi de 81% (Tabela 9). Foram identificados 8 resultados falso-negativos e 15 resultados falso-positivos.

Tabela 9: Avaliação do rt-PCR x POC-CCA para diagnóstico de infecção por *Schistosoma mansoni*, considerando o critério proposto pelo estudo.

		rt-PCR					TOTAL
		Positivo		Negativo			
POC-CCA	Positivo	a	10	b	15	a+b	58
	Negativo	c	8	d	88	c+d	63
TOTAL		a+c	18	b+d	103	N	121
Sensibilidade (IC)		a/(a+c)					10 / 18 = 55,5% (33,7-75,4%)
Especificidade (IC)		d/(b+d)					88 / 103 = 85,4% (77,4-91,0%)
Acurácia (IC)		a+d/N					(10+88) / 121 = 81,0% (73,1-87,0%)

Fonte: autora.

5.6 SÍNTESE E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS OBSERVADOS NOS DIFERENTES MÉTODOS

Analisando-se de forma geral, dentre os métodos avaliados e as análises propostas, a maior sensibilidade apresentada foi a da combinação de testes rt-PCR e POC-CCA, considerando o critério do fabricante (66,7%), seguida do POC-CCA, também considerando o critério do fabricante (65,6%). Levando-se em conta apenas o critério proposto pelo estudo, a maior sensibilidade foi a do rt-PCR (56,3%). O índice menos expressivo foi o do POC-CCA considerando o critério do estudo (43,8%) (Tabela 10).

Em relação à especificidade, a maior taxa apresentada foi a do rt-PCR, seguido do POC-CCA, considerando o critério proposto pelo estudo (87,6%). O índice menos expressivo foi o da combinação de testes rt-PCR e POC-CCA, considerando o critério do fabricante (55,3%). Segundo os índices de acurácia obtidos, o melhor teste é o rt-PCR (88,4%). O índice menos expressivo de acurácia foi obtido pela combinação de testes rt-PCR e POC-CCA, considerando o critério do fabricante (57%) (Tabela 10).

Tabela 10: Síntese e comparação dos parâmetros estatísticos obtidos a partir dos resultados apresentados pelos diferentes métodos diagnósticos.

Métodos	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
Kato-Katz x POC-CCA segundo critério do fabricante (IC)	65,6% (48,3-79,6)	58,4% (48,0-68,1)	60,3% (51,4-68,6)
Kato-Katz x POC-CCA segundo critério do estudo (IC)	43,8% (28,2-60,7)	87,6% (79,2-93,0)	76% (67,7-82,8)
Kato-Katz x rt-PCR (IC)	56,3% (39,3-71,8)	100% (95,9-100)	88,4% (81,5-93,0)
rt-PCR x POC-CCA segundo critério do fabricante (IC)	66,7% (43,7-83,7)	55,3% (45,7-64,6)	57% (48,1-65,5)
rt-PCR x POC-CCA segundo critério do estudo (IC)	55,6% (33,7-75,4)	85,4% (77,4-91,0)	81% (73,1-87,0)

Fonte: autora.

6. DISCUSSÃO

Em localidades endêmicas para a esquistossomose, a fase da doença com maior predomínio é a crônica, gerada pelas exposições constantes a corpos d'água contaminados com cercárias. Neste contexto, a primeira infecção, frequentemente, ocorre por volta de dois anos de idade, tendo um aumento de prevalência e intensidade de infecção em adolescentes e jovens e diminuindo na idade adulta (CONCEIÇÃO e COURA, 1978; COURA-FILHO et al., 1995; FLEMING et al., 2006; COLLEY et al., 2013).

A análise do perfil epidemiológico desse estudo apontou que crianças 1 a 7 anos e adultos de 30 a 39 anos e 40 a 49 anos apresentaram os menores valores de prevalência (25% e 17% ambos, respectivamente). Confirmando as tendências observadas nos estudos citados, a maior taxa de prevalência observou-se na faixa etária de 8 a 17 anos. Este aumento pode ser atribuído tanto à intensidade de infecção e ao tipo e frequência de contato com corpos d'água quanto à imunidade adquirida com o aumento da idade dos indivíduos expostos (KATZ et al, 1978).

O maior número de participantes do estudo são homens (52,9%) e, entre os resultados positivos diagnosticados pelo padrão ouro, a predominância também é masculina (56,2%), contradizendo os achados de Coura Filho et al. (1995). Ambos os gêneros de participantes apresentam semelhante exposição aos riscos de infecção. A comunidade é banhada pelo Rio Jiquiriçá, no qual a população retira água para consumo, nada, pesca, lava roupas e animais, dentre outras atividades, mantendo o contato dessa população com corpos d'água. Porém, a predominância da esquistossomose mansônica em homens pode estar associada à maior susceptibilidade ligada ao seu tipo de trabalho ou atividades recreacionais (SILVA, 2018).

Esforços têm sido empreendidos para o controle e erradicação da esquistossomose, com o surgimento de drogas altamente eficazes e novas técnicas diagnósticas. Porém, a situação epidemiológica nos países em desenvolvimento continua alarmante (ENGELS et al, 2002; SORGHO et al, 2005). A identificação e o tratamento de indivíduos positivos são essenciais, tornando o diagnóstico rápido e preciso como principal fator para controle eficaz da doença (ZHAO et al, 2012). Avaliações de cura ou reinfeção pós-tratamento, ações de monitoramento de morbidade e expansão das áreas endêmicas baseiam-se nos resultados apresentados pelos métodos diagnósticos aplicados na população de estudo (UTZINGER, 2001). Porém, as ações promovidas constantemente pelos programas de controle da

esquistossomose, incluindo os tratamentos quimioterápicos em massa, têm contribuído para aumento do número das áreas de baixa endemicidade e do número de indivíduos com baixa carga parasitária, os quais são mais dificilmente diagnosticados (GRENFELL et al, 2013).

Atualmente, para o diagnóstico da esquistossomose, um dos principais fatores que impulsionou novas investigações foi a revisão do conceito de “padrão-ouro”, definido como método altamente sensível e específico, utilizado em estudos comparativos com um novo teste (CAVALCANTE et al, 2013). Um método padrão é conhecido e reconhecido mundialmente por ser o melhor ou como o melhor método disponível em uma área, preferencialmente validado por publicações em revistas científicas de elevado conceito (OIE, 2010).

As técnicas parasitológicas permanecem como a principal forma diagnóstica da esquistossomose mansônica em áreas endêmicas, as quais permitem visualização microscópica de ovos eliminados junto às fezes do hospedeiro. O Kato-Katz é utilizado em decorrência de sua eficácia diagnóstica, custo-benefício, possibilidade de aplicação mesmo em condições limitadas de infraestrutura laboratorial, fornecimento de medida quantitativa da infecção e habilidade para concomitante diagnóstico de *S. mansoni* e geohelminthos (BERQUIST et al, 2009; UTZINGER, 2011). Entretanto, uma significativa redução da sensibilidade foi constatada em áreas de baixa endemicidade, o que compromete a estimativa de prevalência real da doença (ENK et al, 2008; SIQUEIRA et al, 2012). Além disso, a sensibilidade da técnica também diminui quando aplicada a indivíduos com baixa carga parasitária ou quando se utiliza um número pequeno de lâminas (um ou duas) (RABELLO, 1997). Por conta disso, é necessário monitoramento e avaliações de métodos de detecção mais sensíveis para reavaliação de possíveis reinfecções (BERGEN, 2004).

A baixa sensibilidade dos testes também acarreta a continuação de eliminação de ovos, o que contribui para a manutenção da doença, e expõe os indivíduos ao risco de desenvolvimento de formas ectópicas, assim como outras complicações associadas à morbidade da doença, que podem ocorrer também entre os indivíduos com baixas cargas parasitárias (GRYSEELS et al, 2006; LAMBERTUCCI et al, 2007). Desta forma, enfatiza-se a urgente necessidade de um método diagnóstico mais sensível (ENK et al, 2012). A utilização de estratégias para melhorar os parâmetros dos testes pode facilitar o diagnóstico da esquistossomose e diminuir as falhas de detecção.

Desde 1994, a Organização Mundial de Saúde recomenda o Kato-Katz como método padrão para diagnóstico da esquistossomose, com leitura de duas lâminas. Além das desvantagens já citadas, o diagnóstico ainda pode sofrer interferência em razão da consistência das fezes analisadas, considerando que fezes aquosas não podem ser processadas e fezes muito fibrosas ou secas dificultam a visualização dos ovos (FELDMEIER e POGGENSEE, 1993). Sendo assim, a utilização desta técnica, como único método diagnóstico, tende a subestimar a prevalência da doença.

Nesse estudo, avaliou-se o desempenho diagnóstico do método de POC-CCA e do ensaio molecular de rt-PCR para diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica em indivíduos residentes em uma comunidade rural (Jenipapo), de um município de baixa endemicidade (Ubaíra). Assim, 121 indivíduos foram avaliados pelas três técnicas e os resultados foram analisados e comparados.

Para o Kato-Katz, método padrão ouro deste estudo, foram realizadas leituras de três lâminas por amostra, e também foi avaliado o seu desempenho em comparação com testes imunológicos e moleculares, POC-CCA e rt-PCT, respectivamente. O aumento do número de lâminas de Kato-Katz tem impacto direto na taxa de positividade para infecção por *S. mansoni*, comportamento que é observado em outros estudos (RABELLO,1997; ENK et al, 2008; SIQUEIRA et al, 2011). À medida que se aumenta o número de lâminas analisadas, aumenta-se também a taxa de positividade, elevando a sensibilidade do estudo (COELHO,2016).

A carga parasitária do verme adulto de *S. mansoni* não pode ser quantificada de modo preciso, devido à localização do parasito no hospedeiro. Entretanto, a estimativa pode ser realizada a partir do número de ovos por grama de fezes (OPG). Dos 32 indivíduos positivos diagnosticados pelo padrão ouro, 2 apresentaram alta carga parasitária e 3 apresentaram média carga parasitária, representando 15,6% do total de resultados positivos. Os demais indivíduos (27) apresentaram baixa carga parasitária (84,4%), o que dificulta o diagnóstico, já que a sensibilidade dos métodos parasitológicos diminui quando os indivíduos excretam menos de 100 OPG (WHO, 1995; WHO, 2002; RAMIREZ et al, 1996; RABELLO et al, 1997; HAMILTON et al, 1998; NOYA et al, 2002; DOENHOFF et al, 2004). Além disso, discrepâncias também foram descritas entre a microscopia e a técnica de rt-PCR, em amostras com baixo índice de OPG ou baixa concentração de DNA do parasito (TEN HOVE et al, 2008).

Todos os resultados falso-positivos e falso-negativos obtidos pelos três métodos estão entre os indivíduos com baixa carga parasitária. Esse resultado é esperado, pois a baixa intensidade de infecção torna errática a identificação de ovos do parasito (LAMBERTON et al, 2014). Além disso, dada a baixa sensibilidade do Kato-Katz em áreas de baixa endemicidade, nem todas as infecções ativas de indivíduos com baixa carga parasitária devem ter sido identificadas pelo teste.

Em estudos comparativos, como este, o conhecimento acerca do número de ovos por grama de fezes é importante, pois sabe-se que uma das principais falhas relacionadas aos métodos diagnósticos, para a esquistossomose, é a baixa sensibilidade na detecção de indivíduos com baixa carga parasitária (ENK et al, 2008). O estudo constatou que todos os indivíduos que apresentavam média e alta cargas parasitárias foram diagnosticados como positivos em todos os testes avaliados. Já em relação aos indivíduos com baixa carga parasitária, o desempenho dos métodos avaliados foi bastante heterogêneo.

Em países da África, o POC-CCA mostrou-se apropriado para o diagnóstico da esquistossomose mansônica, principalmente em regiões de moderada e alta transmissão (POLMAN et al, 2000; LEGESSE e ERKO, 2007; ASHTON et al, 2011; COULIBALY et al, 2011; SHANE et al, 2011; NAVARATNAM et al, 2012; COLLEY et al, 2013; COULIBALY et al, 2013; KOUHOUNARI et al, 2013; LODH et al, 2013; SOUZA-FIGUEIREDO et al, 2013; ADRIKO et al, 2014; DEGAREGE et al, 2014; LAMBERTON et al, 2014; OKOYO et al, 2018). Porém, nesse estudo, o POC-CCA revelou resultados não tão promissores (sensibilidade de 43,8% e especificidade de 87,6%), salientando-se, ainda, que a área analisada é de baixa endemicidade. No Brasil, de forma geral, o POC-CCA tem apresentado variação de resultados em diversos estudos (SIQUEIRA et al, 2016; COELHO et al, 2016). Além da obtenção de resultados com baixa sensibilidade, o POC-CCA também pode subestimar o real valor de prevalência.

O POC-CCA identificou 18 resultados falso-negativos, enquanto o rt-PCR identificou 14 falso-negativos. Resultados falso-negativos estão associados à diminuição de sensibilidade. Já em relação aos resultados falso-positivos, o teste de POC-CCA identificou 10 indivíduos e o rt-PCR não registrou nenhum caso. Resultados falso-positivos estão associados à diminuição de especificidade. De fato, o estudo constatou que o POC-CCA apresentou uma taxa de sensibilidade (43,8%) menor do que o rt-PCR (56,2%). A taxa de

especificidade do POC-CCA também foi menor do que a do método molecular (87,6% e 100%, respectivamente).

Vários fatores podem interferir no resultado do POC-CCA, determinando fatores de limitação do teste para o presente estudo e explicando a variação na sensibilidade do diagnóstico de esquistossomose na urina: diabetes melito, infecção urinária, hematúria, ingestão de álcool, uso de drogas ilícitas, diuréticos e desidratação e drogas prescritas (FERREIRA, 2016).

É importante salientar que vermes imaturos, na fase aguda da esquistossomose, ou em casos de reinfecção recente, podem produzir antígenos do parasito (CCA, por exemplo) antes dos ovos serem excretados nas fezes. Isso pode gerar resultados falso-positivos no POC-CCA, quando comparados ao padrão ouro desse estudo (LAMBERTUCCI et al, 2000; LAMBERTUCCI et al, 2010; LAMBERTUCCI et al, 2013). Outros fatores também podem ser destacados: diminuição do volume urinário, em casos de desidratação e concentração da urina (FERREIRA, 2016); alta variabilidade genética de *S. mansoni*, o que pode impactar na alteração dos antígenos catódicos circulantes produzidos, o que contribuiria para diferenças de desempenho do POC-CCA (STOTHARD et al, 2009); quantidade de CCA regurgitada variável ao longo do dia ou ao longo do tempo (STANDLEY et al, 2010); continuação de ovos expelidos pelo hospedeiro, mesmo após a eliminação dos vermes adultos, após o tratamento quimioterápico (STANDLEY et al, 2010). Por outro lado, o uso de álcool e medicamentos hipotensores podem gerar resultados falso-negativos (FERREIRA, 2016).

No estudo de Coulibaly e colaboradores, em 2013, constatou-se boa correlação entre a intensidade de infecção, o número de ovos nas fezes e a intensidade de coloração na fita do POC-CCA. Da mesma forma, no presente estudo, observou-se que os resultados positivos que apresentaram coloração mais intensa foram as 4 amostras de indivíduos com média e alta cargas parasitárias (272 a 584 OPG). Porém, um maior número de casos seria necessário para confirmar a relação entre intensidade da cor e altas cargas parasitárias.

Também observou-se que, nas avaliações em que se considerou o critério do fabricante, houve aumento da sensibilidade e diminuição da especificidade. Contrariamente, nas avaliações em que se considerou o critério do estudo, houve diminuição da sensibilidade e aumento da especificidade. Nas avaliações em que se considerou o critério do fabricante, houve aumento na determinação de resultados positivos e diminuição na determinação de resultados negativos, o que tende a gerar aumento do índice de sensibilidade e diminuição do

índice de especificidade. Em contrapartida, nas avaliações em que se considerou o critério do estudo, houve uma diminuição na determinação de resultados positivos e aumento na determinação de resultados negativos. Isso pode ser constatado pelo número de resultados positivos identificados pelo teste, considerando cada um dos critérios. Levando-se em consideração o critério do estudo, identificou-se 20,7% de resultados positivos e 79,3% de resultados negativos. Analisando-se através do critério do fabricante, identificou-se 47,9% de resultados positivos e 52,1% de resultados negativos. Uma vez que os resultados traço foram identificados em grande parte das amostras totais, (29,7%), o critério escolhido para análise destes tem grande impacto nos índices obtidos pelo presente estudo, de modo geral. Os critérios utilizados para interpretação de resultados traço do POC-CCA são determinantes para os resultados obtidos por qualquer estudo, uma vez que, considerar todos os traços como resultados negativos, pode não identificar infecções ativas satisfatoriamente e, considerar todos os traços como resultados positivos, pode superestimar a prevalência (CAVALCANTI e PERALTA, 2018).

Na última década, o desenvolvimento de testes rápidos tem aumentado, atendendo à necessidade de testes para vigilância de áreas endêmicas e determinação da prevalência em áreas de transmissão e respostas a drogas. Dentro do contexto comunitário, as vantagens de aplicação de testes como o POC-CCA é inegável, inclusive para investigação de infecções ativas em populações susceptíveis como imigrantes e refugiados (PERALTA e CAVALCANTI, 2018). No entanto, a utilização do POC-CCA para monitoramento e diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade ainda é controversa.

Embora o POC-CCA possa superar em sensibilidade e especificidade os métodos convencionais, como o Kato-Katz, em áreas de alta endemicidade, muitos resultados variáveis podem ser encontrados diariamente nessas regiões e reações de baixa reatividade em indivíduos não-excretadores de ovos de *Schistosoma mansoni* podem diagnosticar erroneamente infecções ativas, inclusive em indivíduos já tratados com praziquantel (COULIBALY et al, 2013). Além disso, a reatividade residual (resultados traço) foi bastante demonstrada em indivíduos sem esquistossomose ativa em comunidades com baixa carga parasitária ou com baixa endemicidade (GRENFELL et al, 2018).

Segundo Peralta e Cavalcanti, em 2018, evidências consistentes mostraram aplicação limitada do POC-CCA no diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade e,

mais acentuadamente, em áreas com predomínio de indivíduos com baixa carga parasitária, resultando na diminuição de precisão do teste.

A técnica molecular de PCR para diagnóstico da esquistossomose, em amostras fecais, foi relatada pela primeira vez por Pontes e colaboradores, em 2002. Altos valores de sensibilidade e especificidade foram obtidos por eles e por outros autores (ALLAM et al, 2009; GOMES et al, 2010) quando comparadas aos obtidos pelo Kato-Katz.

Sabe-se que a técnica de rt-PCR está sujeita a diversos fatores que geram falha na amplificação, como erros de pipetagem, funcionamento indevido do termociclador e inibição da enzima Taq Polimerase por reagentes utilizados no processo de extração de DNA. Além disso, as fezes constituem um material com uma diversidade de substâncias que podem atuar como inibidoras, como resíduos alimentares, DNA da flora bacteriana intestinal e até mesmo DNA humano (Wilson et al, 1997; Monteiro et al, 1997; Vanderberg et al, 2002). Por isso, escolheu-se uma técnica comercial, para evitar possível perda de padronização e robustez (QIAamp® DNA Stool Mini Kit). Métodos físicos (separação de salas e materiais, uso de câmara de fluxo laminar com luz UV) foram aplicados durante o procedimento, a fim de minimizar a possibilidade de contaminação das amostras.

Nesse estudo, a técnica apresentou sensibilidade de 56,2%. Resultados diferentes foram obtidos pelo estudo de Ten Hove e colaboradores, em 2008. Além disso, diferentemente do que foi observado pelos autores no trabalho citado, no caso do presente estudo, entre os indivíduos que apresentaram resultados positivos, 77,8% tinham baixa carga parasitária. No estudo de Ten Hove e colaboradores, a maior parte dos indivíduos positivos tinha alta carga parasitária.

A análise dos dados também constatou 14 resultados falso negativos no rt-PCR. Várias razões podem explicar este resultado, inclusive a possibilidade de ausência de ovos na porção de amostra fecal utilizada para a extração de DNA e posterior realização do rt-PCR, dada a variação na eliminação de fezes dos indivíduos com esquistossomose e na distribuição de ovos nas fezes (ENGELS et al, 1996). Outras possíveis razões são a degradação do material genético durante o transporte das amostras do campo para o laboratório, congelamentos e descongelamentos das amostras e a presença de inibidores da reação (MELO, 2006).

Analisando-se os três métodos, na avaliação da sensibilidade, observou-se que os maiores índices foram obtidos pela combinação de testes rt-PCR e POC-CCA, considerando o

critério do fabricante, e pelo POC-CCA, também considerando o critério do fabricante (66,7% e 65,6%, respectivamente). Na combinação de testes, o índice mais alto de sensibilidade identificado no estudo pode ser justificado pelo reconhecido aumento da sensibilidade de testes moleculares, como o rt-PCR. Quanto ao POC-CCA, em ambos os casos citados, pode-se constatar que há um aumento na determinação de resultados positivos, quando considera-se o critério do fabricante, o qual define todos os resultados traço como positivos. Isso pode ser evidenciado, por exemplo, quando comparamos os resultados obtidos pelo POC-CCA considerando os dois critérios (fabricante e estudo). A porcentagem de resultados positivos identificados pelo POC-CCA, considerando o critério do estudo, é de 20,7. Através do critério do fabricante, essa porcentagem aumenta para 47,9, o que tem impacto direto sobre a sensibilidade e pode justificar o aumento desse parâmetro.

Na avaliação da especificidade, observou-se que os maiores índices foram obtidos pelo rt-PCR e pela combinação de testes rt-PCR e POC-CCA, considerando o critério do estudo (100% e 87,6%, respectivamente). O rt-PCR é um método que apresenta altos índices de especificidade descritos pela literatura.

Na avaliação de acurácia, o teste que apresentou melhor desempenho foi o rt-PCR (88,4%), demonstrando que esse método obteve resultados mais próximos da real prevalência da esquistossomose. A reação de rt-PCR constitui-se num importante instrumento diagnóstico, principalmente no caso de doenças infecciosas, em razão de sua capacidade de detectar agentes infecciosas com maior sensibilidade e especificidade, sem que haja necessidade de se encontrarem parasitas viáveis na amostra biológica (HAAS e TORRES, 2016). De modo geral, considerando-se os parâmetros avaliados, o melhor desempenho apresentado foi do método de rt-PCR.

Deve ser salientada a necessidade de aplicação rigorosa da metodologia e medidas de controle de qualidade em todas as etapas das reações, evitando resultados falso-positivos ou falso-negativos por contaminação. Esses critérios são requeridos para uma possível aplicação dos métodos em programas de controle, nos quais as decisões não podem se basear em resultados investigacionais (GOMES et al, 2009).

O maior desafio do uso dos testes moleculares em inquéritos epidemiológicos é o elevado custo das técnicas. O Kato-Katz, enquanto técnica parasitológica, ainda possui as melhores condições de eficácia associadas ao custo, porém os ensaios moleculares, como o rt-PCR, podem apresentar uma alternativa a ser usada em conjunto com as técnicas

parasitológicas, em áreas onde há baixa intensidade de infecção, no intuito de evitar resultados falso-negativos.

A PCR é uma reação comprovadamente sensível, porém, se considerarmos que em amostras com baixa carga parasitária, os ovos estão presentes em baixa frequência ou apresentam-se altamente agrupados no material fecal (GLINZ *et al*, 2010), nos deparamos com o mesmo problema dos métodos parasitológicos, ou seja, a pouca quantidade de amostra utilizada para a reação e, portanto, a menor probabilidade de encontrar ovos na porção especificamente utilizada para produção da lâmina ou para extração de DNA.

Neste estudo, o POC-CCA apresentou um baixo desempenho nos parâmetros avaliados. O teste é particularmente adequado para demonstrar com precisão infecções moderadas a altas de *S. mansoni* e pode ser considerado por outros autores como um método útil para diagnóstico em centros de saúde periféricos e programas de controle da esquistossomose (COELHO,2016), mas neste estudo não apresenta resultados precisos para triagem ou diagnóstico de infecções de baixa intensidade, dada a inconsistência dos resultados apresentados.

Para o controle de transmissão, avaliação clínica mais precisa e diagnóstico, a associação com o rt-PCR e o aumento do número de lâminas analisadas por indivíduo, aumenta a sensibilidade da abordagem. Portanto, o estudo sugere que a associação dos métodos de Kato-Katz e rt-PCR podem aprimorar o diagnóstico da esquistossomose mansônica, principalmente em áreas de baixa endemicidade.

7. CONCLUSÕES

- O POC-CCA avaliado neste estudo apresentou resultados inconsistentes, com baixa acurácia.
- Observamos correlação entre a intensidade de carga parasitária e a intensidade de coloração da reação no teste de POC-CCA.
- O rt-PCR se mostrou uma alternativa viável para diagnóstico da esquistossomose mansônica. Apesar do alto custo, o método poderia ser realizado em laboratórios de referência.
- A associação entre o método parasitológico de Kato-Katz e o método molecular de rt-PCR aumenta sensibilidade, especificidade e acurácia do diagnóstico da esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snails infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1001, supl. 1, p. 145-148, nov. 2006.
- ABDEL-HAFEZ, S. K.; PHILLIPS, S. M.; ZODDA, D. M. *Schistosoma mansoni*: detection and characterization of antigens and antigenemia by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Exp. Parasitol.**, v.55, p.219-232, 1983.
- ADRIKO, M. et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. **Acta Trop.**, Basel, v. 136, p. 50-57, 2014.
- 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**, v. 14, p. 316-321, 2009.
- ANDRADE FILHO, A. S. et al. Neuroesquistossomose. **Revi. Bras. Neurol. Psiquiatria**, v. 19, n. 3, p. 165-209, 2015.
- ASHTON, R. A. et al. Accuracy of circulating cathodic antigen tests for rapid mapping of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infections in southern Súdán. **Trop. Med. Int. Health**, v. 16, p. 1109-1113, 2011.
- BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. Esquistossomose: reprodução e expansão da epidemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 609-616, 1996.
- BARBOSA, C. S. et al. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, v. 53, n. 2, p. 110-114, 2017.
- BERGEN, 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.**, v. 92, p. 205-212, 2004.
- BERGQUIST, R.; JOHANSEN, M.V.; UTZINGER, J. Diagnostic dilemmas in elminthology: what tools to use and when?. **Trends Parasitol**, vol. 25, n. 4, 2009.
- BLANTON, R. E. et al. *Schistosoma mansoni* population structure and persistence after praziquantel treatment in two villages of Bahia, Brazil. **Int. J. for Parasitology**, v. 41, p. 1093-1099, 2011.

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

BLAGG, W. *et al.* A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 4, p. 23- 28, 1955.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de Situação: Bahia**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. A Infecção e a Doença. In: _____. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas**. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BROOKER, S. *et al.* Rapid assessment of *Schistosoma mansoni*: the validity, applicability and cost-effectiveness of the lot quality assurance sampling method in Uganda. **Trop. Med. Int. Health**, v.10, p. 647–658, 2005.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. USA: Academic Press, 2005.

CARLIER, Y. *et al.* Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 24, p. 949-954, 1975.

CARVALHO, O. S *et al.* **Moluscos Brasileiros de Importância Médica**. Belo Horizonte: FIOCRUZ, Centro de Pesquisa René Rachou, 2008.

CAVALCANTI, Marta Guimarães e PERALTA, José Mauro. Schistosomiasis - Updating technologies and diagnostic approaches in surveillance strategies and clinical management. In: SAMIE, Amidou, ed. **An Overview of Tropical Diseases. South Africa**, 2015.

CDC. Neglected Tropical Diseases. **The Burden of Schistosomiasis (Schisto, Bilharzia, Snail Fever)**. 2016.

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

CHISTULO, L.; LOVERDE, P.; ENGELS D. Disease Watch: Schistosomiasis. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 2, n. 12, 2004.

COBLE, M.D. *et al.* **Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians**. **Int. J. Legal Med.**, vol. 118, p. 137-146, 2004.

COELHO, P.M.Z. *et al.* Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 720-723, 2009.

COELHO, P. Z. M. *et al.* Improvement of POC-CCA interpretation by using lyophilization of urine from patients with *Schistosoma mansoni* low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. **Plos Negl. Trop. Dis.**, vol. 10, n. 6, e0004778, 2016.

COLLEY, D. G. *et al.* Human Schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2013.

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

COULIBALY, J. P. *et al.* Accuracy of urine circulating cathodic antigen (CCA) for *Schistosoma mansoni* diagnosis in different settings of Cotê d'Ivoire. **Plos. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1384, 2011.

COULIBALY, J. T. *et al.* Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for ten diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. 2109, 2013.

COURA-FILHO, P. *et al.* Determinantes Ambientais e Sociais da esquistossomose mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n.2, p. 254-265, 1995.

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

DEELDER, A. M. *et al.* *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. **Exp. Parasitol.**, v. 40, 189-197, 1976.

DEELDER, A.M. *et al.* *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. **Exp. Parasitol.**, v. 50, p.16-32, 1980.

DEELDER, A.M. *et al.* Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.71, p. 317-323, 1985.

DEELDER, A. M. *et al.* Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 268–272, 1989.

DEELDER, A. M. *et al.* Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infection by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Trop. Geogr. Med.**, Amsterdam, v. 46, n. 4, p. 233-238, 1994.

DEGAREGE, A. *et al.* Day-to-day fluctuation of point-of-care circulating cathodic antigen test score and faecal egg counts in children infected with *Schistosoma mansoni* in Ethiopia. **BMC Inf. Dis.**, v. 14, p. 210-216, 2014.

- DE JONGE, N. *et al.* Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 756-759, 1991.
- DE VLAS, S.J.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalence. **Parasitol. Today**, v.8, p.274-277, 1992.
- DIVEP. SUVISA. Boletim Epidemiológico da Esquistossomose – Bahia, 2018.
- DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 20, p. 35-39, 2004.
- DORAK, M. T. **Real-Time PCR**. UK: Edições Taylor & Francis Group, 2006.
- EBRAHIM, A. *et al.* Evaluation of the Kato–Katz thick smear and formal ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 706-708, 1997.
- ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and Inestinal Schistosomiasis: Review. **J. Adv. Res.**, v. 4, n. 5, p. 445-52, set. 2013.
- ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSEELS, B. Day-To-Day Egg Count Fluctuation In *Schistosoma mansoni* Infection And Its Operational Implications. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, n. 4, p. 319-324, 1996.
- ENK, M.J. *et al.* The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Trop.**, v. 108, p. 222-228, 2008.
- ENK, M.J.; SILVA, G.,O.; RODRIGUES, N.B. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p.e38947, 2012.
- FELDMEIER, H.; POGGENSEE, G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. **Acta Trop.**, v. 52, p. 205-220, 1993.
- FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S.; Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. **Acta Trop.**, v. 108, n. 2-3, p. 87-97, 2008.
- FERREIRA, F. T. **Sensibilidade e Especificidade do Teste Rápido na Urina (POC-CCA) e Avaliação da Morbidade da Esquistossomose Mansônica em Região de Baixa Prevalência**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

FLEMING, F. M. *et al.* Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 11, p. 56-64, 2006.

FREITAS, L.A.R. *et al.* Doenças Tropicais. In: BRASILEIRO FILHO, G.; BOGLIOLO. **Patologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2016. p. 1411-1516.

GLINZ, D. *et al.* Comparing Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-Transmitted Helminths. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 7, e754, jul. 2010.

GOLD, R.; ROSEN, F. S.; WELLER, T. H. A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Detection of antigen in serum and urine, and correlation between antigenic concentration and worm burden. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, p.545-552, 1969.

GOMES, A. L. V. *et al.* Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosomas mansoni* DNA. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 133-136, out. 2006.

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 Ciências) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

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.**, v.4, n. 4, 2010.

GRENFELL, R. *et al.* New approaches with different types of circulating cathodic antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. **Plos. Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 7, p. e2054, 2013.

GRENFELL, R. F. Q.; TABOADA, D.; COUTINHO, L. A.; PEDROSA, M. L. C.; ASSIS, J. V.; OLIVEIRA, M. S. P.; CRUZ, R. R.; ALMEIDA, A.; SILVA-MORAES, V.; KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Innovative methodology for point-of-care circulating cathodic antigen with rapid urineconcentration for use in the field for detecting low *Schistosoma mansoni* infection and for control of cure with high accuracy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 112, n. 1, p. 1-7, 2018.

GRYSEELS, B. *et al.* Human Schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, set. 2006.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 26, n. 2, p. 383-397, 2012.

GRYSEELS, B.; STRICKLAND, G. M. Schistosomiasis. In: MAGILL, A. J. *et al.* (Eds.). **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. 9th ed. Philadelphia: Editora Elsevier, 2013.

HAMILTON, J. V.; KILNKERT, M.; DOENHOFF, M. J. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes of parasitological and antigen detection methods.

Parasitology, v. 117, p. 41-57, 1998.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. *Rev. Cient. Med.Vet.*, n. 26, 2016.

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

HEID, C. A; STEVENS, J.; LIVAK, K. J. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, vol. 6, n. 10, p. 986-984, 1996.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, nov. 1993.

HOCKLEY DJ. Ultrastrutucure of the tegumento of *Schistosoma mansoni*. **Adv. Parasitol**, v. 11, p. 233-305, 1973.

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

HOKKE, C. H. et al. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 23, p. 165 - 174, mar. 2007.

INGRAM, R. J. *et al.* Penetration of human skin by the cercariae of *Schistosoma mansoni*: an investigation of the effect of multiple cercarial applications. **J. Helminthol.**, v. 77, p. 27-31, 2003.

IBGE. Censo demográfico 2010. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=sobre>. Acesso em: 20 jun. 2018.

INOBAYA, M. T. *et al.* Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. **Rev. Trop. Med.**, v. 5, p. 65-75, 2014.

JAURÈGUIBERRY, S.; PARIS, L.; CAUMES, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 3, p. 225-231, 2010.

JONG, E. C. Schistosomiasis. In: JONG, E. C.; STEVENS, D. **Netter's infectious diseases**. Philadelphia. Editora: Saunders, 2012. p. 516-521.

JURBERG, A. D. *et al.* A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p.112-114, 2008.

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

KATZ, N. A descoberta da esquistossomose no Brasil. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 78, n. 2, p. 123-125, 2008.

KATZ, N; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-43, jan. 2003.

KATZ, Naftale. **Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geohelmintos**. Belo Horizonte: CPqRR, 2018.

KOUHOUNARI, A. *et al.* A latent markov modeling approach to the evaluation of circulating cathodic antigen strips for Schistosomiasis diagnosis pre and pos-praziquantel treatment in Uganda. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 9, p. e1003402, 2013.

KUBISTA, M. *et al.* The real Time polymerase chain reaction. **Mol. Aspect. Med.**, London, v. 27, p. 95-125. may, 2005.

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.**, v. 8, p. e3139, 2014.

LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Trop**, v. 77, p.101-109, 2000.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 422-435, 2010.

LAMBERTUCCI, J.R. *et al.* **An outbreak of acute Schistosoma mansoni schistosomiasis in a noniendemic área of Brazil: a reporto n 50 cases, including five with severe clinical manifestations.** CID, 2013.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, p. 159-174, 197.

LEAL, D. A. G. *et al.* Acute Schistosomiasis in Brazilian traveler: the importance of tourism in the epidemiology of neglected parasitic diseases. **Case Rep. Infect. Dis.**, v. 2012, p. 1-3, 2012.

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

LENZI, H. L. *et al.* Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Orgs.) **Schistosoma**

- mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, p. 85-145.
- LEWIS, F. A.; TUCKER, M. S. Schistosomiasis. In: TOLEDO, R.; FRIED, B. (Eds.) Digenetic Trematodes. New York. Editora Springer, 2014, p. 47-75.
- 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.**, V. 89, p. 46-50, 2013.
- LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.11, p. 121-155, 1919.
- MANDELL, G.L; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases.** Philadelphia: Ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2014.
- McADAM, A.J.; SHARPE, A.H. Doenças infecciosas. In: KUMAR, V. *et al.* (Eds). Robbins & Cotran. **Patologia, bases patológicas das doenças.** Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2010; p. 331-405.
- MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para detecção de *Schistosoma mansoni*.** 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.
- MONTEIRO, L. *et al.* Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 995-998, apr. 1997.
- NAVARATNAM, A. M. D. *et al.* Notes on the use of urine CCA dipsticks for detection of intestinal schistosomiasis in preschools children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, p. 619-622, 2012.
- NOYA, O. *et al.* Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis in Areas of Low Transmission. A review of a line of research. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 97, p. 167-169, 2002.
- NOUR EL DIN, M. S. *et al.* Quantitative determination of circulating soluble egg antigen in urine and serum of *Schistosoma mansoni* infected individuals using a combined two-site enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, p. 585-594, 1994.
- OFFICE International of Epizooties (OIE). World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.** 5th ed. Paris: OIE, 2010. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00082.htm. Acesso em: 20 fev. 2017.
- OKOYO, C.; SIMIYU, E.; NJENGA, S. M.; MWANDAWIRO, C. Comparing the performance of circulating antigen and Kato-Katz techniques in evaluating *Schistosoma mansoni* infection in areas with low prevalence in selected counties of Kenya: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 18, p. 478, 2018.

OLIVEIRA, W. J. **Análise e comparação da sensibilidade e especificidade entre diferentes métodos de diagnóstico para Schistosoma mansoni: Gradiente Salino, Helmintex®, Centrífugo-Sedimentação, Kato-Katz e teste rápido urina (POC-CCA)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

OUELLETTE, A. L. *et al.* Evolving point-of-care diagnostics using up-converting phosphor bioanalytical systems. **Anal. Chem.**, v. 81, n. 9, p. 3216-3221, 2009.

PERALTA, J. M; CAVALCANTI, M. G. Is POC-CCA a truly reliable test for schistosomiasis diagnosis in low endemic areas? The trace results controversy. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 11, 2018.

PIRAJÁ, S. M. A. A contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. **Brasil Med.**, v. 22, p. 281-283, 1908a.

PIRAJÁ, S. M. A. A contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia Dezesesseis observações. **Brasil Med.**, v. 22, p. 441-444, 1908b.

POLMAN, K. *et al.* Specificity of circulating antigen detection for schistosomiasis mansoni in Senegal and Burundi. **Trop. Med. Int. Health**, v. 8, p. 534-537, 2000.

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.

PORDEUS L. C. *et al.* The Occurrence of Acute and Chronic Forms of the Schistosomiasis mansoni in Brazil from 1997 to 2006: A Revision of Literature. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, v. 17, p. 163-175, 2008.

PRATA, A. R.; COURA, J. R. Fases e formas clínicas da Esquistossomose mansônica. In: CARVALHO, O. S. ; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. I. (Orgs). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão disciplinar**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, p. 739-787.

QIAN, Z.L.; DEELDER, A.M. Circulating antigens in Schistosoma-infections. **Acta Leidensia**, v. 49, p. 71-80, 1982.

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 669-676, 1997.

RAMÍREZ, R. M. *et al.* The Immunopathology of Human Schistosomiasis-III. Immunoglobulin Isotype Profiles and Response to Praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, v. 593-599, 1996.

REY, L. Schistosoma e esquistossomose: epidemiologia e controle. In: _____. **Parasitologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991, p. 389-410.

- RICHARDS, F.O. *et al.* Integration of mass drug administration programmed in Nigeria: the challenge of schistosomiasis. **Bull. World Health Organ.**, v. 84, p. 673–676; 2006.
- RIPERT, C. *et al.* Detection with a monoclonal antibody of an antigen characteristic of the genus *Schistosoma* excreted in the urine. **Trop. Med. Parasitol.**, v.39, p. 131-135, 1988.
- ROLLEMBERG, C.V.V. *et al.* Epidemiological characteristics and geographical distribution of schistosomiasis and geohelminths, in the State of Sergipe, according to data from the Schistosomiasis Control Program in Sergipe. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p. 91-96, 2011.
- ROLLINSON, D. *et al.* Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Trop.**, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013.
- ROSS, et al. Katayama syndrome. **The Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 3, p. 218-224, 2007.
- SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, vol. 230, p. 1350-1354, 1985.
- 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** v.133, p.581-587, 2006.
- SANTORO, F. *et al.* Mother-child relationship in human schistosomiasis mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 1164- 1168, 1977.
- SARVEL, A. K. *et al.* Análise da positividade da esquistossomose mansoni em Regionais de Saúde endêmicas em Pernambuco, 2005 a 2010. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 1-6, 2011.
- SILVA, F. L.; DEL-REI, R. P.; FRAGA, D. B. M.; LEONY, L. M.; SOUZA, A. M. G. C.; SANTOS, F. L. N. Alterations in the lipid profiles and circulating liver enzymes in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 51, n. 6, p. 795-801, 2018.
- SIQUEIRA, L.M.V. *et al.* Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a lowtransmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 844-850, 2011.
- SIQUEIRA, L. M. V. **Diagnóstico da Esquistossomose mansoni em áreas de baixa transmissão: avaliação de diferentes técnicas (Kato-Katz, Gradiente Salino, PCR-ELISA e qPCR) antes e após intervenção terapêutica.** Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2015.

SIQUEIRA, L. M. *et al.* Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 49, p. 341-347, 2016.

SHANE, H. L. *et al.* Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in western Kenya. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e951, 2011.

SOBH, M. A. *et al.* Schistosomal specific nephropathy leading to end-stage renal failure. **Kidney Int.**, v.31, p. 1006-1011, 1987.

SOUSA, Mariana Silva. **Up-converting phosphor – lateral flow CAA, Kato-Katz e POC-CCA: a comparative analysis in *Schistosoma mansoni* infection diagnosis in a low endemic area.** Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SOUSA-FIGUEIREDO, J. C. *et al.* The urine circulating cathodic antigen (CCA), dipstick: a valid substitute for microscopy for mapping and point-of-care diagnosis of intestinal schistosomiasis. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. e2008, 2013.

STANDLEY, C. *et al.* Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. **Parasites & Vectors**, London, v. 3:7, 2010.

STEINMANN, P. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis and estimates of people at risk. **The Lancet Infect. Dis.**, v.6, n. 7, p. 411-425, 2006.

STOTHARD, J. R. *et al.* Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. **Acta Trop.**, Basel, v. 97, p. 219–228, 2006.

TAYLOR, C. *et al.* Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochem. J.**, London, v. 291, p. 493-504, Apr. 1993.

TEIXEIRA, C. F. *et al.* Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, vol. 1, n. 2, 2007.

TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2005.

TELES, H. M. S. *et al.* Eficiência do diagnóstico coproscópico de *Schistosoma mansoni* em fezes prensadas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 4, p. 503-507, 2003.

TEN HOVE, R. J. *et al.* Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.102, p.179-185, 2008.

UTZINGER, J. *et al.* Relative contribution of day-to-day and intra specimen variation in faecal egg count of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. **Parasitology**, v. 122, p.537- 544, 2001.

VAN DAM GJ, WICHERS TM, FERREIRA TMF, GHATI D, VAN AMERONGEN A, DEELDER AM. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection circulating cathodic antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5458-5461, 2004.

VANDERBERG, N.; van OORSCHOT, R. A. H. Extraction of Human Nuclear DNA from Feces Samples Using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. **J. Forensic Sci.**, v. 47, n. 5, p. 993-995, sep. 2002.

VAN DER WERF, M. J. *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop.**, v. 89, p. 125-139, 2003.

VAN ETTEN, L. *et al.* Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2404-2406, 1994.

VAN LIESHOUT, L. *et al.* Circulating cathodic antigen levels in serum and urine of schistosomiasis patients before and after chemotherapy with praziquantel. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 311-312, 1993.

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

VITORINO *et al.* Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

VAN'T WOUT, A, B. *et al.* Schistosome circulating anodic antigen in serum of individuals infected with *Schistosoma japonicum* from the Philippines before and after chemotherapy with praziquantel. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 410-413, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of schistosomiasis.** Geneva, p.1-85. Technical Report Series, n° 830, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. **In: Tropical Diseases Research: Progress 1975-1994.** Geneva: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). cap. 5, p. 77-86.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** Geneva: World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health observatory map gallery: world: distribution of Schistosomiasis.** 2016. Disponível em: <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Acesso em: 15 may 2018.

WICHMANN, D. *et al.* Diagnosing Schistosomiasis by Detection of Cell-Free Parasite DNA in Human Plasma. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 4, ap. 2009.

WILSON, I.G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

WILSON, R. A. Oming in on schistosomes: prospects and limitations for postgenomics. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 23, p. 14 - 20, nov. 2006.

WONG, L. M.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. **BioTechniques**, Natick, v. 39, p. 1-11, jul. 2005.

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

ZICKER F.; KATZ N.; WOLF J. Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansônica. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 19, p. 202-207, 1977.

ZIPPER, H. et al. Investigation on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 32, p. 294-299, Nov. 2004.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ E CENTRO MÉDICO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO
CASE

Título do Projeto: A influência da ecologia local em doenças transmitidas pela água
Investigadores Principais: Drs. Mitermayer Reis e Ronald Blanton

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você/seu filho, a seguir designado por "você", está sendo convidado a participar como voluntário no projeto de pesquisa "A influência da ecologia local sobre doenças transmitidas pela água" a ser realizado pela Fundação Oswaldo Cruz em colaboração com a Case Western Reserve University, EUA.

O objetivo desta pesquisa é contribuir para o entendimento da transmissão de um verme conhecido com xistosa (*Schistosoma mansoni*), causa da doença conhecida como "barriga d'água"; e para identificar os indivíduos infectados que podem se beneficiar do tratamento com medicamentos. O estudo também examinará saneamento e seu impacto na saúde.

Os procedimentos e exames que serão realizados incluem: responder a questionário e coleta de amostras de fezes em três dias diferentes para a confirmação da infecção. Estes procedimentos não envolvem qualquer risco para os participantes do estudo. Como benefício, todos os participantes que forem positivos nos exames de fezes para xistosa e outros vermes receberão um laudo e serão tratados pelas autoridades locais. Conforme disponibilidade de recursos, poderemos repetir os exames de fezes por um a três anos.

Quaisquer dúvidas que você deseja perguntar sobre a pesquisa serão respondidas. Você está livre para se recusar a participar, bem como para retirar o seu consentimento a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os investigadores são obrigados a não revelar sua identidade em qualquer circunstância. Todos os dados coletados e os resultados dos exames serão mantidas em sigilo e só serão utilizados para os fins desta pesquisa. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Não há custo para você para a participação neste estudo. Também não está previsto nenhum tipo de ressarcimento neste estudo. Toda a medicação para tratamento dos vermes será gratuitamente fornecido pelas autoridades locais de saúde.

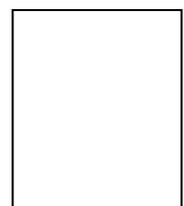
Eu, abaixo assinado, declaro que concordo em participar / participação do meu filho neste estudo. Recebi uma cópia deste formulário de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e resolver minhas dúvidas. Outra cópia será arquivada pelos pesquisadores para comprovação do consentimento.

Marque um "X" em participante ou guardião legal

Assinatura do participante ()

_____ ()
ou guardião legal

Nome do Participante (letra de forma)



Impressão digital do
participante/ guardião legal

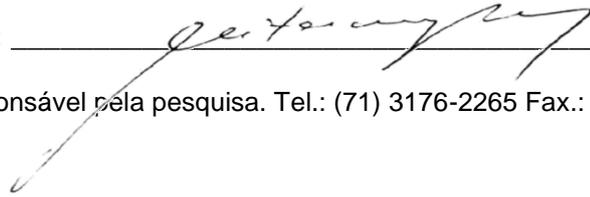
do estudo

Local e Data

Eu ouvi e compreendi este termo de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas e concordo voluntariamente o paciente de quem eu sou legalmente responsáveis participa neste estudo

Assinatura das testemunhas:

Assinatura do pesquisador responsável: _____



Contato: Dr. Mitermayer G. dos Reis. Responsável pela pesquisa. Tel.: (71) 3176-2265 Fax.: (71) 3176-2289.

Compreensão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Marque um "X", se Sim ou Não.	Sim	Não
Você entendeu o termo de consentimento?		
Você tem alguma pergunta a respeito do estudo?		
Perguntas		
Nós vamos coletar suas fezes mais de uma vez?		
Você tem que participar desse estudo?		
Você pode se recusar a participar do estudo a qualquer momento?		
Você tem que pagar para participar deste estudo?		
Você vai receber dinheiro para participar no estudo?		
Nós vamos manter suas informações pessoais em sigilo?		
Você sabe onde encontrar nossos números de contato se tiver alguma questão?		

8.2 ANEXO II: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA CRIANÇAS DE 7 A 13 ANOS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ E CENTRO MÉDICO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO
CASE

Título do Projeto: A influência da ecologia local em doenças transmitidas pela água
Investigadores Principais: Drs. Mitermayer Reis e Ronald Blanton

O que é uma pesquisa?

Uma pesquisa é uma forma de descobrir novas informações sobre alguma coisa. Crianças não precisam participar de um estudo de pesquisa se não quiserem.

Porque você está sendo convidado a participar dessa pesquisa?

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa sobre infecção parasitária. Todas as pessoas de sua comunidade serão convidadas a participar. O propósito desse estudo é determinar como esses parasitas são mantidos na comunidade e como a infecção retorna após o tratamento.

Porque esse estudo está sendo feito?

Os resultados desse estudo nos ajudarão a compreender onde e como as pessoas entram em contato com a infecção e como as infecções retornam para o lugar onde as pessoas foram tratadas. Ovos de parasitas serão estudados para obter indicações do porque a infecção não foi eliminada ou consegue retornar para sua comunidade.

Se você participar nesse estudo, o que acontecerá com você?

Se você concordar em participar, nós iremos fazer algumas perguntas sobre você, sua infecção e seu tratamento. Se você não deseja responder alguma pergunta, você pode pular essa questão e ir para a próxima. Nós também coletaremos suas fezes por três dias diferentes. Se você tiver o parasita da esquistossomose ou outras infecções parasitárias, você será tratado com uma única dose de um ou dois tipos de medicamento. Se você estiver infectado (a) com o parasita para esquistossomose nós também iremos solicitar mais uma amostra de fezes após o tratamento. Você pode ser contactado (a) para responder um questionário e para uma amostra de fezes daqui a alguns anos.

Alguma parte do estudo dói?

Não há riscos para a saúde por oferecer essa informação ou amostra de fezes.

Esse estudo ajudará você?

Quando testarmos suas fezes, se houver uma infecção, alguém irá discutir isso com seus pais e nós iremos informar aos médicos para que eles possam tratá-lo.

Esse estudo ajudará aos outros?

Esse estudo pode descobrir coisas que ajudarão outras crianças e adultos com esquistossomose no futuro.

Meus pais sabem sobre esse estudo?

Esse estudo foi explicado para seus pais e eles disseram que nós poderíamos perguntar a você se você quer participar. Você pode conversar sobre isso com seus pais antes de decidir. Eles também podem participar do estudo.

Quem verá a informação coletada sobre você?

A informação coletada sobre você durante esse estudo será guardada em um lugar seguro. Ninguém saberá exceto as pessoas fazendo a pesquisa.

Você é obrigado a participar?

Você não é obrigado a participar nesse estudo. Ninguém aborrecerá você se você não quiser participar nesse estudo. Se você não quiser participar nesse estudo, você só precisa nos dizer. A decisão é sua. Você também pode pensar mais sobre o assunto antes de decidir.

E se eu tiver dúvidas?

Você pode perguntar qualquer coisa sobre esse estudo. Se você tiver alguma dúvida posteriormente que você não se lembrou de tirar agora, você pode ligar para Dr. Reis (responsável pela pesquisa) através do telefone (71) 3176-2205. Você também pode pensar mais sobre sua participação no estudo e conversar com seus pais sobre isso.

Outras informações sobre o estudo:

Se você decidir participar do estudo, por favor, escreva seu nome abaixo. Você pode mudar de idéia e deixar de participar em qualquer tempo. Você só precisa dizer às pessoas que estão à frente da pesquisa. Se você quiser, você pode ter uma cópia desse papel para guardar.

Escreva seu nome

Assinatura da criança

Eu discuti essa pesquisa com _____ usando uma linguagem compreensível e apropriada. Eu acredito que informei completamente ele / ela sobre a natureza do estudo e seus possíveis riscos e benefícios. Eu acredito que o participante entendeu essa explicação e consentiu sua participação no estudo.

Testemunha

Data

8.3 ANEXO III: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA ADOLESCENTES DE 14 A 17 ANOS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ E CENTRO MÉDICO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO
CASE

Título do Projeto: A influência da ecologia local em doenças transmitidas pela água
Investigadores Principais: Drs. Mitermayer Reis e Ronald Blanton

Nome do(a) adolescente

O que é uma pesquisa?

Uma pesquisa é uma forma de descobrir novas informações sobre alguma coisa. Crianças não precisam participar de um estudo de pesquisa se não quiserem.

Porque você está sendo convidado a participar dessa pesquisa?

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa sobre infecção parasitária. Todas as pessoas de sua comunidade serão convidadas a participar. O propósito desse estudo é determinar como esses parasitas são mantidos na comunidade e como a infecção retorna após o tratamento.

Porque esse estudo está sendo feito?

Os resultados desse estudo nos ajudarão a compreender onde e como as pessoas entram em contato com a infecção e como as infecções retornam para o lugar onde as pessoas foram tratadas. Ovos de parasitas serão estudados para obter indicações do porque a infecção não foi eliminada ou consegue retornar para sua comunidade.

Se você participar nesse estudo, o que acontecerá com você?

Se você concordar em participar, nós iremos fazer algumas perguntas sobre você, seu contato com a água e qualquer tratamento para parasitas. Essas perguntas irão ajudar-nos a compreender onde e como as pessoas entram em contato com a infecção. Se você não deseja responder alguma pergunta, você pode pular essa questão e ir para a próxima. Nós também coletaremos suas fezes por três dias diferentes. O DNA do parasita será extraído dessas fezes e nós o usaremos para estudar o parasita, procurando por indicações sobre porque este não é eliminado ou é capaz de retornar à sua comunidade. Se você tiver o parasita da esquistossomose ou outras infecções parasitárias, você será tratado com uma única dose de dois tipos de medicamento pelos agentes de saúde locais sob a supervisão do Ministério da Saúde. Esses medicamentos são padrão para esse tipo de infecção, em doses também padrão. Se você estiver infectado(a) com o parasita da esquistossomose nós também iremos solicitar mais uma amostra de fezes após o tratamento. Você poderá ser contatado(a) para responder a um questionário e coletar uma amostra de fezes daqui a alguns anos.

Alguma parte do estudo dói?

Não há riscos para a saúde por oferecer essa informação ou amostra de fezes.

Esse estudo ajudará você?

Quando testarmos suas fezes, se houver uma infecção, alguém irá discutir isso com seus pais e nós iremos informar aos médicos para que eles possam tratá-lo.

Esse estudo ajudará aos outros?

Esse estudo pode descobrir coisas que ajudarão outras crianças e adultos com esquistossomose no futuro.

Meus pais sabem sobre esse estudo?

Esse estudo foi explicado para seus pais e eles disseram que nós poderíamos perguntar a você se você quer participar. Você pode conversar sobre isso com seus pais antes de decidir. Eles também podem participar do estudo.

Quem verá a informação coletada sobre você?

A informação coletada sobre você durante esse estudo será guardada em um lugar seguro. Ninguém saberá exceto as pessoas fazendo a pesquisa.

Você é obrigado a participar?

Você não é obrigado a participar nesse estudo. Ninguém aborrecerá você se você não quiser participar nesse estudo. Se você não quiser participar nesse estudo, você só precisa nos dizer. A decisão é sua. Você também pode pensar mais sobre o assunto antes de decidir.

E se eu tiver dúvidas?

Você pode perguntar qualquer coisa sobre esse estudo. Se você tiver alguma dúvida posteriormente que você não se lembrou de tirar agora, você pode ligar para Dr. Reis (responsável pela pesquisa) através do telefone (71) 3176-2205. Você também pode pensar mais sobre sua participação no estudo e conversar com seus pais sobre isso.

Outras informações sobre o estudo:

Se você decidir participar do estudo, por favor, escreva seu nome abaixo. Você pode mudar de idéia e deixar de participar em qualquer tempo. Você só precisa dizer às pessoas que estão à frente da pesquisa. Se você quiser, você pode ter uma cópia desse papel para guardar.

 Assinatura do(a) adolescente

 Data

 Testemunha

 Data