

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO OVO DE *Schistosoma mansonii* E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO PELO IMUNOENSAIO DE ELISA INDIRETA EMPREGANDO AMOSTRAS SOROLÓGICAS HUMANAS

por

Vanessa Silva Moraes

Belo Horizonte
Julho/2018

TESE

DCS – IRR

V. S. MORAES

2018

VANESSA SILVA MORAES

PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO OVO DE *Schistosoma mansonii* E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO PELO IMUNOENSAIO DE ELISA INDIRETA EMPREGANDO AMOSTRAS SOROLÓGICAS HUMANAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Coorientadores: Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz
Dra. Lisa Shollenberger McEwen

Colaboradores: Dr. William de Castro Borges
Dra. Ana Lúcia Teles Rabello
Dr. Donald A Harn

Belo Horizonte
Julho/2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

M827p
2018

Moraes, Vanessa Silva.

Produção de uma proteína recombinante do ovo de *Schistosoma mansoni* e avaliação de desempenho pelo imunoenensaio de ELISA indireta empregando amostras sorológicas humanas/ Vanessa Silva Moraes – Belo Horizonte, 2018.

XX, 170 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 140 - 164

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

1. *Schistosoma mansoni* 2. Imunodiagnóstico 3. Área endêmica I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Grenfell, Rafaella Fortini (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

VANESSA SILVA MORAES

PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO OVO DE *Schistosoma manson* E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO PELO IMUNOENSAIO DE ELISA INDIRETA EMPREGANDO AMOSTRAS SOROLÓGICAS HUMANAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho (Titular)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Calvazara (Titular)

Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho (Titular)

Prof. Dra. Viviane Cristina Fernandes dos Santos (Titular)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 04/07/2018

Dedico este trabalho a todos os pacientes que ainda são acometidos pelas doenças tropicais e negligenciadas. Que de alguma forma todo o meu esforço e dedicação cheguem até vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradecer. Talvez um dos tópicos mais difíceis dessa tese. A caminhada foi longa e repleta de pessoas que merecem algumas palavras de afeto e admiração.

Primeiramente agradeço a Deus, meu maior companheiro na caminhada para chegar até aqui. Minha fé, minhas orações e da minha família me conduziram a passos pequenos ao final dessa trajetória. “Confia, Descansa e Espera”.

Ao meu orientador Paulo Marcos. Muito obrigada seria pouco para agradecer tudo que o senhor fez por mim e minha família. Pessoa a quem me cabe uma admiração imensa de pesquisador e ser humano. Acolheu-me sem receios no Laboratório de Esquistossomose para o desenvolvimento deste trabalho. Estendeu sua mão como um verdadeiro pai quando as barreiras financeiras e da distância de casa foram maiores. Um dos exemplos profissionais a quem quero seguir.

A minha coorientadora Rafaella Queiroz. Sou imensamente grata às oportunidades e os caminhos que trilhei ao seu lado. Aos ensinamentos que adquiri ao longo desses 8 anos de trabalho. Gratidão também pelas experiências pessoais, as descobertas que fizemos juntas e os bons momentos que ultrapassaram a linha entre orientador e aluno. A você meus sinceros agradecimentos por tudo.

A minha coorientadora Lisa Shollenberger, muito obrigada pela acolhida na Universidade da Geórgia. Por se fazer presente nos momentos de ausência de casa. Por confiar no meu trabalho e me dar tarefas as quais eu pensei não dar conta. Muito obrigada por tudo! Compartilho minha gratidão também ao Donald Harn, o qual da mesma maneira me acolheu tão bem na Universidade da Geórgia e agora está me recebendo de volta para trilhar mais uma etapa da minha carreira. Obrigada por fazer dessa experiência em Athens muito especial. Obrigada por acreditar em mim e me receber novamente para integrar sua equipe.

Ao Dr. Naftale Katz pelas trocas de experiências, por dividir seus conhecimentos comigo e me fazer sentir um pouco pesquisadora nesses últimos 4 anos.

Ao meu querido Elio Babá, que não mediu esforços para sentar ao meu lado na bancada e me ensinar por horas os enigmas da bioquímica. Obrigada também por me introduzir no Laboratório de Proteômica onde desenvolvi parte dos resultados desse trabalho.

William Borges, colaborador desse trabalho e um grande amigo que a vida me proporcionou. Obrigada por me receber no seu laboratório quando não sabia nada de proteômica e por permitir que eu ficasse aquelas 2 semanas que se tornaram 6 meses com

você. Muito obrigada por me fazer sentir em casa e me ensinar valiosos valores de ser humano e pesquisador. Ao Leandro, Mariana, Juliana, Ananda, Bruno e a toda equipe do LEP meu agradecimento especial!

A Ana Rabello pela dedicação a minha orientação nesses 4 anos. Obrigada por ser sempre receptiva e estar disposta a ajudar. Obrigada também pelos conselhos profissionais e pessoais que sempre me inspiraram muito.

A Flora Kano pelos ensinamentos durante alguns passos desse projeto e as experiências de vida compartilhadas! Obrigada pelo incentivo de sempre e também por não permitir que eu desistisse da purificação daquela proteína!

A secretária Jussara (Jujuba) obrigada por atender de maneira tão amorosa as nossas solicitações e sempre levantar o astral de quem está perto de você com essa alegria contagiante. Obrigada pelo carinho, por tudo!

Flávia muito obrigada pela amizade ao longo dos anos e principalmente nos últimos 3 anos. Você preencheu as lacunas de família quando a distância apertava e eu precisava me reerguer, pois sabia que minha família precisava mais de mim do que eu deles. Obrigada pela força constante!

As meninas do TECADI, muito obrigada por tudo nesses 2 anos de convivência! Acreditem, aprendi mais com vocês do que vocês comigo. Lucélia obrigada por espalhar esse amor imensurável a Deus que nos fortalece a cada dia. Jéssica obrigada por mostrar que a vida é bem mais que uma bancada de experimentos e precisa de sorrisos. Malu obrigada por essa doçura de menina e esse olhar de mãe, obrigada pelos lanchinhos depois do expediente. Rê obrigada pelos bons conselhos da “vida adulta”, admiro a mulher que você é. Carol, Carolzita, meu muito obrigado mais que especial. Obrigada por ser essa companheira tão dedicada e que eu confiava de olhos fechados na execução dos experimentos. Obrigada por me conceder a oportunidade de compartilhar um pouquinho do que sei com você.

Aos demais integrantes do Laboratório de Esquistossomose, Áureo, Patrícia, Elmo, Alana, Natália, Cynthia, muito obrigada pelo companheirismo. Aos alunos da Pós-graduação. Aos moradores das áreas endêmicas. A Sra. Cleusa, Sr. João e Adriana. Os trabalhos no campo com vocês ganhavam outro sentido. Obrigada por me receber tão bem e me ensinar importantes valores de vida!

Neusa e Sueleny, as mães que o laboratório me deu! Obrigada por esse carinho aconchegante, os cafés e os bons conselhos da vida! Diana muito obrigada pelas palavras e mensagens de carinho, por me dar colo quando eu precisava!

Patty, quantas emoções vivemos nesse doutorado compartilhando a doce amargura das proteínas recombinantes. Aprendo com você, que chora, mas sempre está com um sorriso no rosto alegrando a gente com esse “Montesclarês”! Lindicy, o MedTrop me fez conhecer uma cientista sensacional e uma amiga que levarei para sempre comigo. Obrigada por tudo!

Obrigada ao meu amigo Dudu, o irmão que a vida me deu. Obrigada por tudo que representa na minha vida. Obrigada por segurar na minha mão e fortalecer minha fé. Obrigada por me fazer acreditar em dias melhores. Nathalie obrigada pelos momentos de laboratório, pela contribuição nos passos iniciais deste trabalho e também por todos os momentos que vivemos fora dele.

Obrigada Lili, uma pessoa super especial que fui conhecendo aos pouquinhos com as viagens de campo. Quantas histórias temos para contar. Você me ensinou o sentido do trabalho de campo. Wander meu amigo, sua pequena aqui não tem palavras para agradecer o tamanho desse carinho comigo. Você sempre disposto a ajudar da melhor forma tanto na vida pessoal como na profissional. Muito obrigada Ana Carolina, que mesmo aí do outro lado mantém a sintonia sempre presente. Fábio, obrigada meu amigo por esse abraço carinhoso de todos os dias. Viviane muito obrigada pelos ensinamentos no período do laboratório e fora dele. Você é uma pessoa de coração enorme e te admiro e sou grata por isso. Gardênia e Dília vocês foram muito importantes no dia a dia do laboratório.

Obrigada às famílias que me acolheram ao longo dessa caminhada, Cláudia e Fábio em Ouro Preto, Cristiane e Rozeli em Divinópolis, Rodrigo e Camila em Athens. Obrigada família de Athens, Lia, Nuria, Ciro, Rafa e Luiz por deixar a vida do lado de lá mais leve e amenizar as saudades de casa. Juliana e o grupo da Bioinfo obrigada por me deixar ser um de vocês na hora do cafezinho.

Obrigada à tia Lucinha e ao tio Laercio que abriram as portas da sua casa quando cheguei a Belo Horizonte, por sempre me tratarem como filha e me fazer sentir amada no seu lar. Nunca saberei agradecer esses 8 anos ao lado de vocês. Thaís minha irmã de alma, essa tese também é sua. Você compartilhou comigo as noites em claro nessa reta final. Rafa e Laísa, obrigada pelo companheirismo de sempre. Lúcia obrigada por esse carinho de mãe e por cuidar tão bem de mim.

Obrigado mais que especial a minha mãe, Marina Goreti, pela força e amor de sempre. Pelos ensinamentos que ultrapassam a barreira científica, por me ensinar a cada dia ser uma pessoa melhor. Obrigada pela dedicação mesmo quando seu tempo era escasso. Meu pai Omar, pelo exemplo de trabalho e honestidade. Obrigada as minhas irmãs, Elisângela e Ariádna, por me apoiarem e compartilharem comigo as alegrias e as tristezas do dia a dia.

Obrigada por abrirem mão das próprias conquistas para aplaudir a minha. Principalmente, por mostrarem que nosso amor e união superam qualquer obstáculo. Parte dessa conquista eu devo a vocês. Ao meu irmão Rodrigo, obrigada por me inspirar a ser uma pessoa melhor todos os dias. Os obstáculos que cercam o Autismo são pequenos para você. Deus nos deu um presente e vamos fazer de tudo para cuidar dele da melhor maneira possível. Aos meus queridos avós pelas infinitas orações. A Tia Rita, por ser essa mãe e amiga de sempre!

Obrigada ao Francisco, pelo lugar importante na minha vida e principalmente pela compreensão nesses últimos meses. Você foi essencial nessa caminhada.

Agradeço também a Biblioteca IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Muito obrigada Andréa e Patrícia e todos os membros sempre pela atenção prestada aos alunos. A coordenação do Programa em especial a professora Luzia Carvalho por atender sempre com muita atenção as nossas solicitações.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Obrigada à CAPES e também as demais agências financiadoras CNPq, Fapemig, FIOCRUZ, AACC e UGA que fizeram possível a execução deste projeto.

RESUMO

A esquistossomose ainda é considerada um problema de saúde pública mundial. O avanço integrado das ações de controle nos últimos anos resultou na diminuição da morbidade e consequentemente no aumento de áreas de baixa endemicidade (caracterizada por indivíduos eliminando < 100 ovos por gramas de fezes - opg). O diagnóstico padronizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o teste parasitológico de Kato-Katz (K-K) o qual é baseado na detecção de ovos nas fezes. Embora seja o método de certeza na identificação dos casos, o mesmo apresenta baixa sensibilidade quando a eliminação de ovos pelos indivíduos nas fezes é baixa. Além disso, o mesmo não é aplicável à fase que antecede a oviposição (pré-patente). O teste imunocromatográfico POC-CCA® está comercialmente disponível e tem sido avaliado em diferentes áreas da África e Brasil. Esse teste possui vantagens por ser um teste rápido e acessível à área de campo, entretanto resultados divergentes tem sido encontrados no Brasil. Visando a disponibilidade de mais alternativas de diagnóstico para a doença, este trabalho propôs a seleção de antígenos do extrato solúvel do ovo (SEA) de *Schistosoma mansoni* através da análise imunoproteômica. Embora o SEA seja um dos antígenos brutos mais empregados nos imunoenaios, o fracionamento do mesmo na busca de marcadores de diagnóstico ainda é escassa. Neste estudo, 23 spots foram imunorreativos ao soro de indivíduos positivos para *S. mansoni*. Destes, 22 foram também reconhecidos por amostras de indivíduos infectados por outros helmintos e 10 spots por amostras de indivíduos negativos. Apenas um spot, identificado como *Major Egg Antigen* (MEA), foi exclusivamente reconhecido pelas amostras de indivíduos positivos para *S. mansoni*. MEA recombinante (MEAr) foi produzida em sistema heterólogo de bactérias e manteve a antigenicidade após a purificação. A detecção de anticorpos por ELISA (IgG-ELISA-MEAR) foi empregada utilizando amostras positivas de área endêmica e amostras negativas de área não endêmica (controle). IgG-ELISA-MEAR determinou uma área sob a curva (ASC) de 0,94 sem diferença significativa com IgG-ELISA-SEA (ASC = 0,94) e IgG-ELISA-SWAP (ASC = 0,96). Com uma sensibilidade de 87,10% e especificidade de 84,62%, o teste foi capaz de identificar 87,5% (56/64) indivíduos com cargas ≤ 10 opg dos quais 27 apresentavam 1 opg. IgG-ELISA-MEAR apresentou Kappa = 0,71 (*substantial agreement*) sem diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao método de referência (K-K 18/24L). Concluída a padronização, o teste foi avaliado na discriminação de indivíduos positivos e negativos residentes de áreas endêmicas. Assim como IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP, IgG-ELISA-MEAR demonstrou baixa especificidade (< 50%) nessa análise. Em indivíduos de fase aguda infectados através do primeiro contato com uma área de transmissão, IgG-ELISA-MEAR determinou uma sensibilidade de 89,8%. Embora a técnica de IgG-ELISA-MEAR não tenha sido superior aos antígenos brutos, deve-se levar em conta a disponibilidade da produção em larga escala dos antígenos recombinantes, difícil de ser alcançada pelos antígenos brutos devido a infraestrutura necessária para manutenção do ciclo biológico de *S. mansoni*. Os dados apresentados neste trabalho poderão contribuir para o aperfeiçoamento de estratégias de controle da esquistossomose em áreas de baixa prevalência assim como abrir perspectivas para o desenvolvimento de técnicas que envolvam a detecção direta de MEAr através da produção de anticorpos monoclonais.

Palavras chave: Doença de Chagas, *Schistosoma mansoni*, Imunodiagnóstico, Área endêmica

ABSTRACT

Schistosomiasis is a worldwide public health problem. Control actions in the past years has decreased the morbidity and, consequently, increased the presence of low endemicity áreas (characterized by individuals eliminating < 100 eggs per gram of feces - epg). The reference diagnosis by World Health Organization (WHO) is the parasitological test of Kato-Katz (K-K) which is based on the detection of eggs in feces. This test presents low sensitive in individuals eliminating less than 100 epg. In addition, the K-K does not attend the phase prior to oviposition. The POC-CCA® is a commercially test available that has been evaluated in several settings of Africa and Brazil. The value of this test is due to it to be quick and easy to use in low resources field. However, discordant results related to trace readings and low sensitivity in low burdens individuals have been reported. Searching for new alternatives for Schistosomiasis diagnostics, the goal of this work was to identify a new target from soluble egg antigens (SEA). Here, 23 spots were immunoreactive to the positive serum from *S. mansoni*. Of these, 22 were also recognized by serum from individuals with other helminths infections and 10 spots from negative individuals. One single spot, the Major Egg Antigen (MEA), was recognized from *S. mansoni* positive samples. Recombinant MEA (MEAr) was produced and its antigenicity kept after purification. Antibody detection by ELISA (IgG-ELISA-MEAR) was evaluated using positive samples from endemic area and negative samples from non-endemic área (control). IgG-ELISA-MEAR determined an area under curve (AUC) of 0.94 with no significant difference with IgG-ELISA-SEA (AUC = 0.94) and IgG-ELISA-SWAP (AUC = 0.96). The cut-off point was selected according to the accuracy index represented for a sensitivity of 87.10% and a specificity of 84.62%. The IgG-ELISA-MEAR was able to identify 87.5% (56/64) individuals with loads \leq 10 epg, of which 27 had 1 epg. IgG-ELISA-MEAR showed Kappa = 0.71 (substantial agreement) over the reference method (K-K 18 / 24L). The test was also evaluated in positive and negative individuals from endemic area. Similar to IgG-ELISA-SEA and IgG-ELISA-SWAP, IgG-ELISA-MEAR showed low specificity (<50%) in this analysis. In acute phase, IgG-ELISA-MEAR determined a sensitivity of 89.8%. Although IgG-ELISA-MEAR technique has not been superior to the crude antigens, a large-scale production is available by the recombinant antigens and should be taken into account. Crude antigens need a complex infrastructure for maintenance of the *S. mansoni* biological cycle. The rMEA showed not to be higher than crude antigens. However the data presented here can contribute to the improvement of other indirect immunoassays plataforms as open the doors for the development of techniques that involve the monoclonal antibody detection.

Key words: Chagas Disease, Schistosoma mansoni, Immunodiagnosis, Endemic area

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Definição de áreas endêmicas	20
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Padronização de IgG-ELISA-MEAr.....	102
Gráfico 2: Curva ROC do IgG-ELISA-MEAr (A) IgG-ELISA-SEA (B) e IgG-ELISA-SWAP (C).....	104
Gráfico 3: Comparação das curvas ROC do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP.....	104
Gráfico 4: Dispersão do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP.....	106
Gráfico 5: Taxa de positividade do IgG-ELISA e K-K.....	110
Gráfico 6: Taxa de positividade de acordo com a carga parasitária (opg).....	110
Gráfico 7: Regressão linear entre a carga parasitária (opg) e a DO do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP.....	111
Gráfico 8: Desempenho do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de residentes da área endêmica de Tabuas.....	113
Gráfico 9: Taxa de positividade do IgG-ELISA e K-K na área de Tabuas.....	115
Gráfico 10: Taxa de positividade da área de Tabuas obtida de acordo com a carga parasitária (opg).....	115
Gráfico 11: Desempenho das técnicas IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP na discriminação de indivíduos antes e após o tratamento com PZQ.....	116
Gráfico 12: Taxa de cura obtida pelo IgG-ELISA após 180 dias de tratamento com PZQ....	117
Gráfico 13: Desempenho do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de residentes da área endêmica de Estreito de Miralta.....	119
Gráfico 14: Taxa de positividade do IgG-ELISA e K-K na área de Estreito de Miralta.....	121
Gráfico 15: Taxa de positividade da área de Tabuas obtida de acordo com a carga parasitária (opg).....	121
Gráfico 16: Desempenho das técnicas IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP na discriminação de indivíduos antes e após o tratamento com PZQ.....	122
Gráfico 17: Taxa de cura obtida pelo IgG-ELISA após 180 dias de tratamento com PZQ..	123
Gráfico 18: Desempenho do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de indivíduos negativos residentes em área sem transmissão próximos a áreas endêmicas.....	124
Gráfico 19: Taxa de positividade de indivíduos residentes da área de Samambaia.....	124
Gráfico 20: Desempenho do IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de indivíduos em fase aguda da infecção.....	125
Gráfico 21: Taxa de positividade de turistas de São Joao Del Rei.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mapa mundial da prevalência da esquistossomose, 2012.....	28
Figura 2:	Distribuição da esquistossomose de acordo com o INPEG 2010/2015.....	28
Figura 3:	Localização espacial de Minas Gerais com a região endêmica em destaque....	29
Figura 4:	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Figura 5:	Definição das fases dos programas de controle direcionados a eliminação da esquistossomose.	37
Figura 6:	Aparelho da técnica do Gradiente Salínico.....	41
Figura 7:	Fluxograma de estudo.....	56
Figura 8:	Localização de área rural endêmica de Montes Claros, Minas Gerais.....	57
Figura 9:	Cachoeira da localidade de Tabuas, na zona rural de Montes Claros, Minas Gerais.....	58
Figura 10:	Rio e residentes da localidade de Estreito de Miralta, Montes Claros, Minas Gerais.....	59
Figura 11:	Área de Samambaia localizada na zona rural do município de Montes Claros, Minas Gerais.....	61
Figura 12:	Delineamento experimental murino.....	62
Figura 13:	Ilustração esquemática da reação de recombinação BP para formação do clone de entrada com a sequência de interesse.....	70
Figura 14:	Ilustração esquemática da reação de recombinação LR para formação do clone de expressão com a sequência de interesse.....	71
Figura 15:	Estratégia de trabalho para a produção da proteína MEAr.....	72
Figura 16:	Desenho esquemático do vetor doador pDONR221 e vetor de destino pEXP1-DEST.....	74
Figura 17:	Fluxograma das amostras utilizadas na aplicação de MEAr do diagnóstico da esquistossomose.....	78
Figura 18:	Frações imunorreativas detectadas por WB-SEA em pool de amostras murinas.....	84
Figura 19:	Frações imunorreativas detectadas por WB-SEA em amostras de indivíduos em diferentes fases de infecção.....	84
Figura 20:	Frações imunorreativas detectadas por WB-SEA em amostras de indivíduos infectados por diferentes helmintos.....	85
Figura 21:	Perfil eletroforético 1D (A) e 2D do SEA bruto (B) e precipitado por TCA-acetona (C).....	86
Figura 22:	Padronização do WB após precipitação do extrato por TCA-acetona utilizando pool de amostras murinas (A) e humanas (B).....	87
Figura 23:	Deglicosilação do SEA com metaperiodato de sódio.....	87
Figura 24:	2D-PAGE (A), WB-2D (B) e WB-2D após deglicosilação com metaperiodato de sódio (C).....	89
Figura 25:	Representação dos spots reconhecidos nos experimentos de WB-2D.....	90
Figura 26:	Expressão do transcrito MEA.....	94
Figura 27:	Perfil eletroforético da amplificação de MEA.....	95
Figura 28:	Perfil eletroforético da amplificação de MEA com sítios <i>att</i>	96
Figura 29:	Perfil eletroforético dos clones de entrada.....	96
Figura 30:	Perfil eletroforético dos clones de destino.....	97
Figura 31:	Predição do peso molecular de MEAr (43 kDa).....	98

Figura 32: Perfil eletroforético dos produtos da expressão de MEAr.....	98
Figura 33: WB-his dos produtos da expressão de MEAr.....	99
Figura 34: Produtos da purificação de MEAr.....	99
Figura 35: WB-MEAR utilizando amostra positiva e negativa para <i>S. mansoni</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação das intensidades de infecção segundo a OMS.....	26
Tabela 2:	Primers utilizados para amplificação de MEA.....	74
Tabela 3:	Tabela de contingência 2x2 para cálculo dos índices de acurácia diagnóstica...	79
Tabela 4:	Grau de concordância segundo Landis e Koch*	79
Tabela 5:	Proteínas imunorreativas identificadas nos experimentos de 2D-WB.....	91
Tabela 6:	Comparativo dos spots imunogênicos aos pools de soro identificados no WB-2D antes e após a oxidação dos carboidratos pelo metaperiodato de sódio.....	93
Tabela 7:	Análise <i>in silico</i> de MEA.....	95
Tabela 8:	Identificação por espectrometria de massas (Shotgun) do produto final purificado.....	100
Tabela 9:	Classificação dos indivíduos positivos utilizados na padronização de IgG-ELISA-MEAr.....	101
Tabela 10:	Coefficiente de variação das amostras positivas e negativas no estudo preliminar de repetitividade do IgG-ELISA-MEAr.....	103
Tabela 11:	Índices de desempenho na discriminação de indivíduos positivos (n = 93) e negativos (n = 65).....	106
Tabela 12:	Taxa de positividade de acordo com a carga parasitária pelo método de referência.....	108
Tabela 13:	Avaliação de desempenho do IgG-ELISA e K-K (2 L) na discriminação de indivíduos positivos (n = 93) e negativos (n = 65) para <i>S. mansoni</i>	110
Tabela 14:	Classificação dos indivíduos residentes de Tabuas pela carga parasitária.....	112
Tabela 15:	Taxa de positividade de Tabuas de acordo com a carga parasitária obtida pelo método de referência.....	114
Tabela 16:	Avaliação de desempenho do IgG-ELISA e K-K (2 L) na discriminação de indivíduos positivos (n = 40) e negativos (n = 80) para <i>S. mansoni</i> residentes de Tabuas.....	115
Tabela 17:	Classificação dos indivíduos residentes de Estreito de Miralta pela carga parasitária.....	118
Tabela 18:	Taxa de positividade de Estreito de acordo com a carga parasitária pelo método de referência.....	120
Tabela 19:	Avaliação de desempenho do IgG-ELISA e K-K (2 L) na discriminação de indivíduos positivos (n = 32) e negativos (n = 104) para <i>S. mansoni</i> residentes de Estreito de Miralta.....	121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
2-DE	Eletroforese bidimensional
2D-PAGE	Gel de poliacrilamida bidimensional
AAC	Antígeno anódico circulante
ACC	Antígeno catódico circulante
ACN	Acetonitrila
ASC	Área sob a curva
DAILY	Indicador que quantifica o número perdido em anos de vida devido a problemas relacionados com a doença, do inglês: <i>disability-adjusted life years</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
dPI	Dias após infecção
dPT	Dias após tratamento
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático de absorção, do inglês: <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISA-SEA	Ensaio imunoenzimático absorvido com antígeno solúvel do ovo
ELISA-SWAP	Ensaio imunoenzimático absorvido com o antígeno solúvel do verme adulto
FC	Amostras de fase crônica
FA	Amostras de fase aguda
GS	Gradiente Salínico
HRP	Peroxidase de raiz forte, do inglês: <i>horseradish peroxidase</i>
HT	Amostras de diferentes helmintos
IAA	Iodoacetamida
IEF	Isoeletrofocalização
K-K	Kato-Katz
LF	Fluxo lateral

MEA	<i>Major egg antigen</i>
NN	Amostras negativas de área não endêmica
NE	Amostras negativas de área de reagiao endêmica
NEE	Amostras negativas de área endêmica
OPG	Ovos por grama de fezes
PBS	Tampão fosfato-salina, do inglês: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-T 0,05 %	Tampão fosfato-salina com 0,05 % de Tween, do inglês: <i>Phosphate-buffered saline and Tween</i>
PC	Ponto de corte
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
PCT	Terapia preventiva, do inglês: <i>Preventive chemotherapy</i>
PIC	Coquetel de inibidor de protease, do inglês: <i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PZQ	Praziquantel
RDT	Teste rápido de diagnóstico, do inglês: <i>Rapid diagnostic test</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - Dodecil sulfato de sódio, do inglês: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEA	Antígeno solúvel de ovo, do inglês: <i>Soluble egg antigen</i>
SSTA	Extrato solúvel de tegumento de esquistossômulos
SNC	Sistema nervoso central
SWAP	Preparado de antígeno solúvel do verme, do inglês: <i>Soluble worm antigen preparation</i>
TBS	Tampão tris-salina, do inglês: <i>Tris-buffer saline</i>
TBS-T 1%	Tampão tris-salina com 0,05 % de Tween, do inglês: <i>Tris-buffered saline and Tween</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TTO	Amostras após o tratamento
WB-1D	<i>Western blotting</i> unidimensional
WB-2D	<i>Western blotting</i> bidimensional
WB	Ensaio imunoenzimático de <i>Western blotting</i>
WB-SEA	<i>Western-blotting</i> adsorvido com o antígeno solúvel do ovo
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 Esquistossomose: aspectos gerais e epidemiologia	26
3.2 Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	29
3.3 Controle da esquistossomose mansoni.....	31
3.4 Imunopatologia da esquistossomose mansoni	33
3.5 Diagnósticos disponíveis	36
3.5.1 Métodos parasitológicos.....	37
3.5.2 Métodos imunológicos	42
3.5.3 Testes moleculares	53
4 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 Fluxograma de Estudo	55
4.2 Aspectos éticos.....	55
4.3 Obtenção de amostras	56
4.3.1 Amostras humanas	56
4.3.2 Amostras murinas.....	61
4.4 Preparação do extrato solúvel de ovos de <i>S. mansoni</i> (SEA)	62
4.4.1 Preparação do SEA.....	62
4.4.2 Precipitação de proteínas por TCA-acetona.....	63
4.5 Eletroforese e <i>Western blotting</i>	63
4.5.1 <i>Western blotting</i> unidimensional (WB).....	63
4.5.2 <i>Western blotting</i> bidimensional (WB-2D)	64
4.5.3 <i>Western blotting</i> com deglicosilação dos antígenos.....	65
4.5.4 Coloração de géis de poliacrilamida por Azul de Coomassie Colloidal	66
4.6 Digestão <i>in gel</i> e preparo de amostras para espectrometria de massas.....	66
4.6.1 Digestão trípica	66
4.6.2 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	67
4.6.3 Identificação das proteínas	68
4.7 Produção da proteína recombinante.....	68

4.7.1 Tecnologia Gateway®.....	69
4.7.2 Amplificação e purificação do gene de interesse: MEA.....	72
4.7.3 Clonagem.....	74
4.7.4 Expressão de MEAr.....	76
4.7.5 Purificação de MEAr.....	77
4.8 Aplicação de MEAr no diagnóstico da esquistossomose.....	77
4.8.1 Definição dos parâmetros do ensaio IgG-ELISA-MEAR.....	78
4.8.2 Índices utilizados na avaliação do desempenho do IgG-ELISA-MEAR.....	79
4.8.3 Intensidade de infecção.....	80
4.8.4 ELISA para detecção de IgG específicos para SEA (IgG-ELISA-SEA) e antígenos solúveis de verme adulto (IgG-ELISA-SWAP).....	81
4.9 Análise estatística.....	81
5 RESULTADOS.....	82
5.1 WB-SEA empregando amostras murinas e humanas.....	82
5.2 Análises imunoproteômicas.....	84
5.2.1 Caracterização do extrato por eletroforese.....	84
5.2.2 Padronização do WB unidimensional.....	85
5.2.3 Seleção de proteínas reconhecidas pelas amostras sorológicas humanas no WB-2D.....	87
5.2.4 Comparação do perfil de reconhecimento das amostras sorológicas humanas de indivíduos infectados com <i>S. mansoni</i> e demais grupos antes e após a deglicosilação....	91
5.3 Análise <i>in silico</i> da proteína selecionada.....	93
5.4 Produção de MEAr.....	94
5.4.1 Amplificação e clonagem de MEA.....	94
5.4.2 Expressão e purificação de MEA.....	96
5.5 Avaliação da antigenicidade de MEAr.....	99
5.6 Aplicação do IgG-ELISA-MEAR na detecção da esquistossomose mansoni.....	100
5.6.1 Avaliação do desempenho de IgG-ELISA-MEAR.....	100
5.6.2 Validade diagnóstica em diferentes grupos de estudo.....	110
6 DISCUSSÃO.....	126
7 CONCLUSÃO.....	139
REFERÊNCIAS.....	140
ANEXOS.....	165

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é considerada um problema de saúde pública mundial apesar dos sucessivos programas de controle adotados. O *Global Health Estimates* de 2015 atribuiu 3,51 milhões de *disability-adjusted life years* (DALYs) e 10,1 mil mortes a doença em 2016 (WHO, 2016b; GBD, 2017). Aproximadamente 249 milhões de pessoas estão infectadas em 78 países do mundo e mais de 779 milhões vivem em áreas endêmicas (Steinmann *et al.*, 2006; WHO, 2012a). A doença acomete regiões tropicais e subtropicais, em áreas com populações de baixa renda com um importante impacto socioeconômico. Nas Américas, o Brasil é o país mais afetado, sendo a doença causada pela espécie *Schistosoma mansoni* (Coura e Amaral, 2004; WHO/PAHO, 2016).

O desenvolvimento socioeconômico bem como o acesso ao saneamento básico adequado e tratamento medicamentoso, levaram a redução considerável do número de pessoas infectadas e da morbidade, como também a interrupção da transmissão em alguns países (WHO, 2013). O avanço integrado nos últimos anos das ações descritas acima permitiu que a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciasse em 2012 no WHO/NTDs *Road Map* os novos objetivos para 2020 com a progressiva mudança de “controle da morbidade” para “eliminação da doença como um problema de saúde pública” (WHO, 2012a; c). As metas foram delineadas baseadas no perfil epidemiológico de cada país. No Brasil, a determinação foi intensificar o controle da morbidade até 2019 e interromper a transmissão em 2021 (WHO/PAHO, 2014).

Nos primeiros anos do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) a prevalência no Brasil reduziu de 23% para 9% (1977-1979) (Coura e Amaral, 2004). Com a melhoria do abastecimento de água e rede de esgoto, aplicação de moluscidas em larga escala, avaliação intensa de casos em áreas de risco e disponibilidade do tratamento com Praziquantel (PZQ) na rede pública a prevalência chegou a 4,5% em 2012 (Katz, 2018). Recentemente, o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses (INPEG), realizado no período de 2010 a 2015, determinou a prevalência de 0,99% (Katz, 2018). Apesar da queda significativa da prevalência, a doença continua expandindo e adquirindo novo perfil epidemiológico. A transmissão contínua está concentrada nas regiões do Sudeste (1,27%) e Nordeste (2,35%), afetando principalmente populações de baixa renda, sendo estas

relacionadas à falta de acesso ao saneamento básico. Minas Gerais e Pernambuco foram os estados mais afetados, segundo registro do último inquérito (WHO/PAHO, 2014; Katz, 2018).

As estratégias adotadas no Brasil são baseadas em saneamento básico, educação em saúde, diagnóstico individual e tratamento dos indivíduos infectados. Dentre essas, o diagnóstico está entre um dos desafios para cumprir as metas da OMS (Fenwick *et al.*, 2006; Utzinger *et al.*, 2011). O método para diagnóstico recomendado pela OMS é a técnica parasitológica de Kato-Katz (K-K), baseada na identificação e quantificação dos ovos nas fezes utilizando a análise de 2 lâminas em 1 amostra (K-K 2L/1A)(Katz *et al.*, 1972; WHO/PAHO, 2014). No início dos programas de controle, quando a prevalência e intensidade de infecção são geralmente altas, acima de 50% com indivíduos eliminando mais que 400 ovos por grama de fezes (opg), esse método demonstrava elevada acurácia empregando a análise de 2 lâminas. Entretanto, o controle intensificado ao longo dos anos vem ocasionando o surgimento de áreas de baixa endemicidade e baixa transmissão, as quais são caracterizadas pela presença de indivíduos com baixa intensidade de infecção (< 100 opg) (Quadro 1) (Favre, 2012; Cavalcanti *et al.*, 2013; MS, 2014; Cosenza *et al.*, 2017). Neste novo cenário, a falta de sensibilidade da técnica é a maior dificuldade encontrada no diagnóstico. Atualmente, o Brasil é um país de baixa prevalência (< 10 %) com indivíduos eliminando < 100 opg morando em áreas endêmicas e casos agudos derivados da migração interna (Martins *et al.*, 1998; Enk, Amaral, *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2011). Os residentes infectados das áreas endêmicas que não são identificados como tal contribuem para manutenção da transmissão local e o estabelecimento de novos focos quando se deslocam para outras regiões. Estes novos focos resultam em casos agudos graves levando ao aumento significativo de índices de mortalidade e morbidade.

Quadro 1: Definição de áreas endêmicas

Área de baixa endemicidade	Área com prevalência < 10% e indivíduos com baixa intensidade de infecção (< 100 ovos por grama de fezes). Indivíduos são assintomáticos/oligossintomáticos.
Área de baixa transmissão	Área com distribuição focal de caramujos <i>Biomphalaria spp.</i> e prevalência ≤ 25%. Predominância (≥ 75%) de indivíduos com baixa intensidade de infecção (< 100 ovos por grama de fezes) e baixa morbidade. A maior parte dos indivíduos é assintomática.

Na resolução WHA65.21 de 2012, onde a estratégia para eliminação da esquistossomose foi programada, especial atenção foi dada para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico adaptadas a qualquer contexto epidemiológico (alta ou baixa transmissão) e que possam ser empregadas nos diferentes estágios dos programas de controle

(mapeamento, monitoramento das intervenções, vigilância pós eliminação) (WHO, 2012c; Knopp *et al.*, 2013; Utzinger *et al.*, 2015). Muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas a fim de serem introduzidas nas diretrizes da OMS para o combate da esquistossomose. Entretanto, o método de K-K ainda é a ferramenta padronizada para determinar prevalência, indicar morbidade, elaborar medidas de controle e fazer a vigilância epidemiológica após interrupção da transmissão e eliminação (Steinmann *et al.*, 2006; Utzinger *et al.*, 2015). A capacidade de determinar a intensidade da infecção através da quantificação dos ovos, baixo custo operacional e praticidade em situações de infraestrutura laboratorial precária são vantagens que mantêm essa técnica como “padrão ouro” pela OMS (Knopp *et al.*, 2013).

A acurácia do diagnóstico é um critério exigido para o sucesso do controle da morbidade e interrupção da transmissão no Brasil. O tratamento em massa (*mass drug administration* - MDA) não é adotado no país, sendo este conduzido por meio do diagnóstico individual (Favre *et al.*, 2015). Siqueira e colaboradores (2015) demonstraram a subestimação da prevalência em 3,5 vezes quando o protocolo recomendado pela OMS (K-K 2L/1A) (WHO/PAHO, 2014) foi comparado a uma avaliação parasitológica extensa (K-K 18L/4A) (Siqueira *et al.*, 2015). Outro fator limitante da técnica de K-K é a detecção apenas da fase pós-postural, não detectando a infecção nos estágios iniciais (Enk, Katz, *et al.*, 2008; Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013). Isso retarda o tratamento e aumenta a gravidade das lesões devido aos ovos depositados diariamente nos tecidos. Tendo em vista as limitações do método adotado como referência e o perfil epidemiológico atual, existe a necessidade da padronização de novas metodologias de diagnóstico que possam ser implementadas no controle da doença. Características como alta sensibilidade e especificidade, identificação da infecção ativa e na fase pré-postural, eficácia na avaliação da cura após tratamento, fácil execução, baixo custo e o fornecimento de resultados precisos em qualquer condição de infecção (alta ou baixa carga parasitária) estão entre os critérios no desenvolvimento de novos métodos (Doenhoff *et al.*, 2004; Grenfell, Silva-Moraes, *et al.*, 2012; Cavalcanti *et al.*, 2013; Utzinger *et al.*, 2015). Enquanto o teste capaz de atender a esses critérios ainda não está disponível, a combinação de diferentes técnicas têm sido adotada a fim de aumentar a detecção dos casos e atender os programas de controle (Bergquist *et al.*, 2009; Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013; Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013; Grenfell *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2018).

A associação de K-K com imunoenaios baseados na captura direta de antígenos ou por pesquisa de anticorpos específicos mostra-se sensível e promissora na identificação da infecção em amostras com resultados croscópicos negativos (Kanamura *et al.*, 1998;

Oliveira *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2006; Da Frota *et al.*, 2011; Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013). Durante a infecção, o sistema imune do hospedeiro desencadeia uma acentuada produção de anticorpos contra antígenos do parasito e do ovo. Os imunoenaios indiretos, baseados na detecção de anticorpos, possuem uma alta sensibilidade e seu uso tem sido ampliado na detecção de indivíduos de áreas não endêmicas e em áreas de baixa endemicidade. A sorologia positiva em amostras de indivíduos não residentes de áreas que estiveram em contato com algum foco de transmissão pode ser suficiente para conduzir o tratamento, uma vez que as técnicas parasitológicas não são eficientes devido à ausência de ovos nas fezes (Van Gool *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2012). O valor atribuído a essas técnicas em áreas endêmicas está relacionado à identificação de indivíduos com baixas cargas parasitárias. O emprego dessas metodologias como ferramentas de triagem e na elaboração de algoritmos têm aumentado a detecção de indivíduos com baixa intensidade de infecção em estudos de áreas endêmicas (Sorgho *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2006; Da Frota *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2012; Espirito-Santo *et al.*, 2014). Embora a detecção de anticorpos seja promissora, seu uso ainda é limitado nas áreas endêmicas frente à incapacidade de distinguir entre infecções atuais e passadas. Além disso, os residentes dessas áreas possuem altos títulos de anticorpos devido à exposição a antígenos do parasito sem estarem infectados (Cavalcanti *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2014).

Uma alternativa para melhorar a eficiência dos testes indiretos, é a detecção de anticorpos contra antígenos específicos. Os extratos brutos das formas evolutivas que entram em contato com o hospedeiro (verme adulto e ovo) são os antígenos mais utilizados devido à abundância de material antigênico. Mesmo com comprovada eficiência, esses extratos levam a perda de especificidade devido à ocorrência de reações cruzadas com outros helmintos quando frações antigênicas comuns são reconhecidas, especialmente glicanas (Alarcon De Noya *et al.*, 2000; Boukli *et al.*, 2011). O uso de antígenos recombinantes associado às técnicas indiretas tem atribuído uma especificidade superior em relação aos antígenos brutos na acurácia do diagnóstico em áreas de baixa endemicidade (Grenfell, R., Harn, D. A., *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014).

A detecção direta de antígenos, a partir da produção *in vitro* de anticorpos específicos, vem se destacando em relação às técnicas indiretas. Embora a sensibilidade dessas técnicas possa ser comprometida em casos de baixa carga parasitária, as mesmas são superiores devido à alta especificidade na identificação da infecção ativa, a avaliação da cura após tratamento e correlação com a intensidade de infecção (Van Lieshout *et al.*, 2000; Van Dam *et al.*, 2004; Corstjens *et al.*, 2008; Grenfell *et al.*, 2014). O teste imunocromatográfico baseado na

detecção do antígeno catódico circulante (CCA) na urina, POC-CCA[®], está comercialmente disponível. As principais vantagens deste teste estão relacionadas a ser um teste rápido, com resultados em 20 min na área de campo e o uso de amostras não invasivas como urina. POC-CCA[®] vem sendo avaliado em diferentes áreas do Brasil e da África a fim de ser oficialmente introduzido nos programas de controle, entretanto, ainda não alcançou desempenho satisfatório para isso (Colley *et al.*, 2013; Adriko *et al.*, 2014; Kittur *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2016; Lindholz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018). A alta taxa de positividade deste teste em áreas de baixa endemicidade tem sido atribuída principalmente à ausência de um teste de referência adotado durante a avaliação do desempenho do POC-CCA[®] (Siqueira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018) e a interpretação dos resultados “traços” como positivos quando a grande maioria deles têm se mostrado como negativos (Coelho *et al.*, 2016; Grenfell *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

A imunoproteômica de extratos brutos associada com a tecnologia de antígenos recombinantes vem contribuindo para busca de novos candidatos ao diagnóstico (Mutapi *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010; Ludolf *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). A possibilidade do rastreamento de frações específicas para diferentes grupos amostrais, identificação e produção na forma recombinante constitui um caminho na padronização de métodos diferenciais. Baseado nesse contexto, a hipótese deste trabalho é que a aplicação de um antígeno específico na detecção de anticorpos aumenta a sensibilidade do diagnóstico em indivíduos de baixa carga parasitária e seu uso contribui para o aperfeiçoamento das estratégias de controle da doença. Sendo assim, o objetivo foi identificar frações imunorreativas do extrato solúvel de ovo (SEA) de *S. mansoni* com potencial para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Por meio da técnica de imunoproteômica, foram utilizadas amostras sorológicas de indivíduos positivos para *S. mansoni* (fase aguda e crônica), indivíduos após 180 dias do tratamento com PZQ, indivíduos negativos e indivíduos infectados com outros helmintos. A seleção dessas amostras foi realizada a fim de obter antígenos com potencial para detectar qualquer estágio da infecção e, ainda, eliminar resultados falso-positivos e reações cruzadas com demais parasitos.

Continua sendo um grande desafio encontrar um único método que atenda a todos os critérios de um teste ideal, considerando que grande parte das áreas acometidas é caracterizada por infecções de baixas intensidade e, conseqüentemente, difíceis de serem detectadas pela metodologia convencional (K-K 2 L) (Cavalcanti *et al.*, 2013; Knopp *et al.*, 2013). Em 2012, a OMS enfatizou a necessidade da mudança por busca de métodos altamente sensíveis e específicos em áreas que estão sob controle de morbidade e transmissão, em

relação a métodos baratos com desempenho satisfatório apenas em áreas com alta prevalência (Ntids, 2012; Knopp *et al.*, 2013; Utzinger *et al.*, 2015). Aliado a alta sensibilidade e especificidade das técnicas imunológicas com a disponibilidade dessas técnicas em formatos rápidos como tiras imunocromatográficas (Corstjens *et al.*, 2014; Nausch *et al.*, 2014; Utzinger *et al.*, 2015), esse trabalho propôs a produção de um novo antígeno recombinante, o qual poderá ser empregado no desenvolvimento de novos imunoenaios. O uso do antígeno na detecção de anticorpos, assim como a produção de anticorpos monoclonais específicos e aplicação dos mesmos na detecção direta de antígenos, poderão preencher algumas lacunas no caminho do teste ideal e contribuir na estratégias de controle adotadas frente ao plano de eliminação da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e produzir um antígeno recombinante do extrato solúvel do ovo de *S. mansoni* e avaliar seu desempenho no imunodiagnóstico da esquistossomose mansoni por ELISA indireta.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras de fezes, soro, urina e saliva de indivíduos residentes das áreas endêmicas da zona rural de Montes Claros, Minas Gerais, antes e após tratamento com PZQ;
- Identificar as proteínas do ovo *S. mansoni* que são reconhecidas por anticorpos presentes no soro dos indivíduos infectados;
- Avaliar correatividade das proteínas identificadas pelos soros de pacientes infectados com *S. mansoni* com soros de indivíduos saudáveis, infectados com outros helmintos e após o tratamento com PZQ;
- Avaliar a presença de epitopos glicosilados das proteínas selecionadas;
- Selecionar uma proteína com potencial para o imunodiagnóstico e realizar a produção em sistema procarioto,
- Padronizar ELISA indireta utilizando o antígeno recombinante e amostras humanas positivas e negativas;
- Avaliar a validade do imunodiagnóstico em amostras sorológicas humanas de diferentes áreas endêmicas de Minas Gerais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Esquistossomose: aspectos gerais e epidemiologia

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos digenéticos de diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, prevalente principalmente em áreas tropicais e subtropicais (Figura 1). O ser humano é o principal reservatório vertebrado tendo o caramujo como hospedeiro intermediário. A ocorrência da doença está relacionada à ausência ou precariedade de saneamento básico, afetando principalmente as populações pobres e marginalizadas dos países em desenvolvimento (Steinmann *et al.*, 2006; Utzinger *et al.*, 2011). Mundialmente, estima-se que cerca de 249 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente 92% desses indivíduos vivem no continente Africano, considerado local de maior transmissão e mortalidade (WHO, 2017). Por ano, 280.000 mortes são atribuídas à doença e as complicações decorrentes da fase crônica (Van Der Werf *et al.*, 2003). Em 2015, a esquistossomose foi à terceira no *ranking* das doenças negligenciadas do mundo com 3,51 milhões de perdas em DALY, perdendo apenas para Malária e Chagas (WHO, 2016b).

Programas de controle adotados no Japão, China e Egito tem demonstrado sucesso no controle da morbidade e redução da prevalência nos últimos anos, principalmente devido à implementação do tratamento em massa com PZQ (Rollinson *et al.*, 2013; WHO/PAHO, 2014). Com essa progressão, as novas metas foram lançadas na resolução WHA65.21 de 2012 priorizando a eliminação da doença como um problema de saúde pública. Um dos objetivos da OMS é tratar pelo menos 75% de todas as crianças com idades escolares residentes de países endêmicos para esquistossomose até 2020 (WHO, 2017) e desenvolver métodos de diagnósticos mais sensíveis para detecção de infecções de baixa intensidade (< 100 opg) (Tabela1) (WHO, 2011). No Brasil, a determinação foi intensificar o controle da morbidade até 2019 e interromper a transmissão até 2021 (Ntds, 2012; WHO/PAHO, 2014).

Tabela 1: Classificação das intensidades de infecção segundo a OMS

Intensidade da infecção	Número de ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados por grama de fezes (opg)
Leve ou baixa	1 - 99
Moderada ou média	100 - 399
Intensa ou alta	≥ 400

Fonte (WHO, 2011)

De fato, as medidas de controle adotadas no Brasil têm alcançado redução da prevalência ao longo dos últimos 40 anos. Três inquéritos de abrangência nacional foram conduzidos no Brasil. O primeiro por Pellon & Teixeira (1947-1952), o segundo pelo PCE (1975-1979) e o terceiro pelo Ministério da Saúde e Fiocruz, o INPEG (2010-2015). Considerando-se os dados encontrados em 11 estados endêmicos para esquistossomose, a positividade nestes três inquéritos caiu de 10,09% para 9,24% e 1,79%, respectivamente (Katz, 2018). O INPEG foi o primeiro inquérito com abrangência em todos os estados da Federação. A principal causa da queda da positividade está relacionada à urbanização e consequentemente o acesso ao saneamento básico e o abastecimento de água domiciliar. Outro fator relevante são os tratamentos específicos que vem sendo sucessivamente realizados mediante o diagnóstico individual de casos com medicamentos de baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais, usados em dose única por via oral com baixo custo (Katz, 2018).

Na maior parte do Brasil, o risco de transmissão é considerado moderado (Figura 2). No INPEG as regiões Nordeste e Sudeste apresentaram os maiores índices de positividade, sendo de 1,27% e 2,35%, respectivamente. Na região Norte, a positividade foi de 0,01%, na Centro-Oeste de 0,02% e Sul nenhum caso foi diagnosticado. Nas áreas endêmicas para esquistossomose, a proporção de positivos foi de 0,27% e 3,28% nos municípios com mais ou menos de 500.000 habitantes, respectivamente. Os estados que apresentaram as maiores proporções de positivos, nos municípios com população até 500 mil habitantes, estavam localizados em Sergipe (10,67%), Pernambuco (3,77%), Alagoas (3,35%), Minas Gerais (5,81%) e Bahia (2,91%). Nos municípios com mais de 500.000 habitantes, os índices foram acentuados no Rio de Janeiro (2,80%) em Pernambuco (2,48%) e em Sergipe (2,28%). Com exceção do Espírito Santo (1,02%), em todos os outros estados a proporção de positivos foi menor que 0,5% (Katz, 2018) (Figura 2).

Mesmo com sucessivas ações no combate da esquistossomose, constataram-se ainda altas taxas de positividade nos estados de Sergipe, Minas Gerais (Figura 3), Alagoas, Bahia e Pernambuco. No Brasil, as áreas com prevalências da doença acima de 25%, são classificadas como alta endemicidade, entre 5 e 25% média e igual ou inferior a 5%, baixa endemicidade (Favre, 2012; MS, 2014). Nas últimas décadas os casos foram detectados através da técnica de K-K, analisando 1 ou 2 lâminas de uma amostra dependendo da determinação do Ministério da Saúde (Favre, 2012; MS, 2014). O INPEG foi realizado utilizando 2 lâminas, o que permite a inferência da prevalência 3 a 4 vezes maior baseando-se na limitação do método frente ao perfil epidemiológico atual do país caracterizado por infecções de baixa intensidade. Esse fator foi estimado de acordo com trabalhos prévios realizados em diferentes áreas

endêmicas do Norte de Minas Gerais, empregando uma rigorosa avaliação parasitológica, visando um número mais próximo da real prevalência da esquistossomose (Siqueira *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016). Esses dados confirmam que a prevalência está subestimada devido à baixa sensibilidade do método atualmente empregado (K-K 2L/1A). Uma vez que a prevalência é um indicador na elaboração de estratégias de controle, a subestimação de casos pode influenciar nas tomadas de decisões e delineamento de novas metas quando a eliminação é um objetivo a ser alcançado (WHO, 2012a).

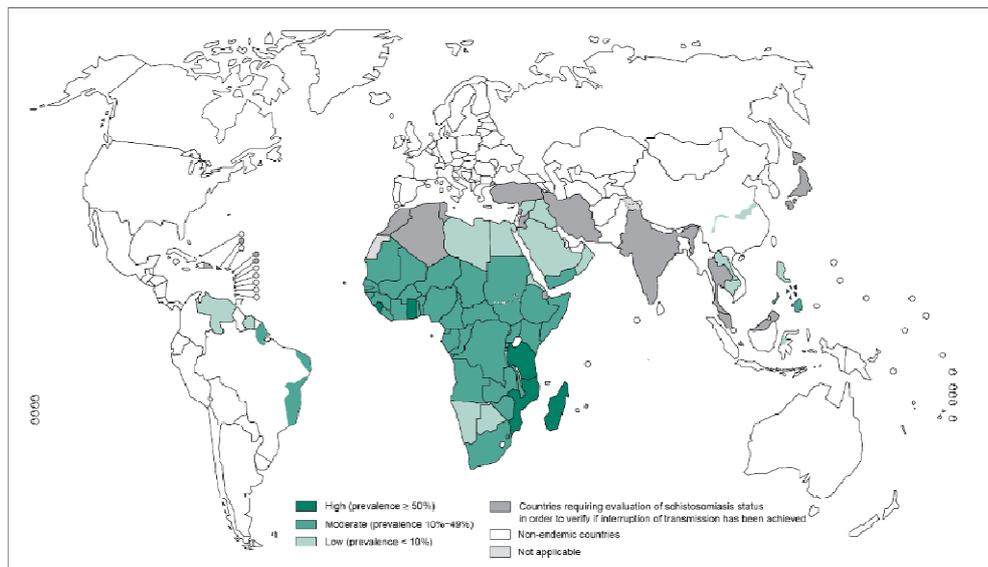


Figura 1: Mapa mundial da prevalência da esquistossomose, 2012. Fonte: WHO 2012. Disponível em <http://www.WHO.int/schistosomiasis/Schistosomiasis_2012-01.png?ua=1>. Acesso em 15 de maio de 2018.

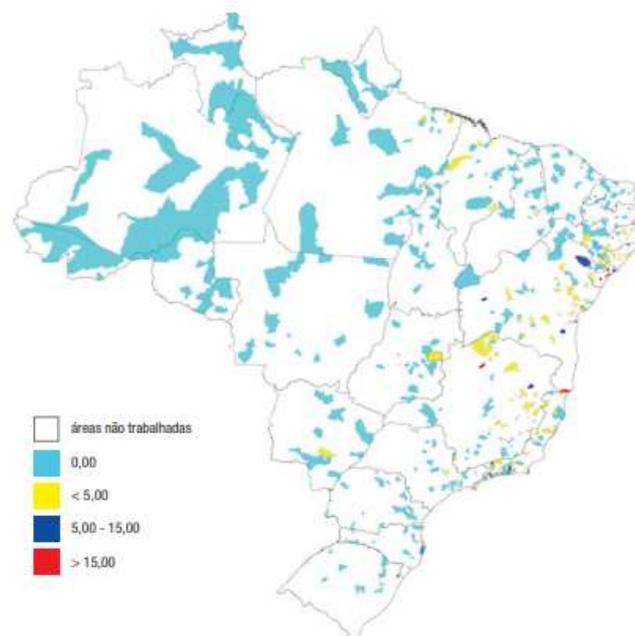


Figura 2: Distribuição da esquistossomose de acordo com o INPEG 2010/2015. Fonte: INPEG 2018. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sinan/inpeg/RelatorioINPEG.pdf>>. Acesso em 15 de maio de 2018.

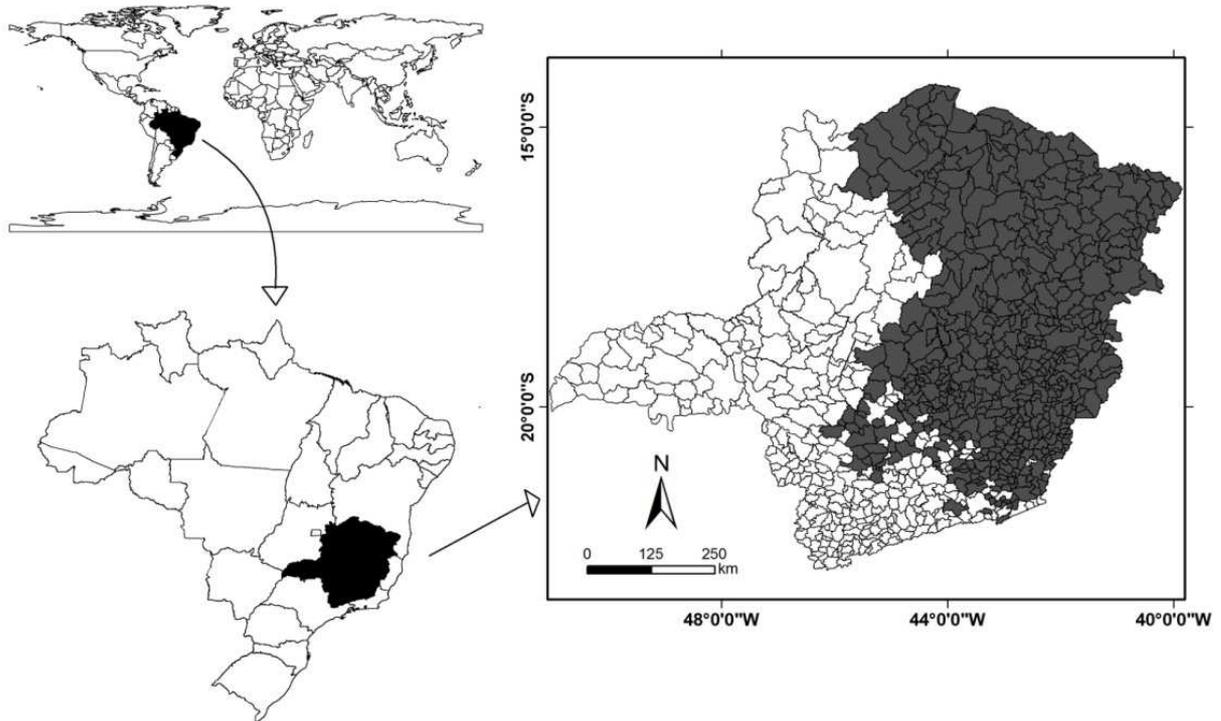


Figura 3: Localização espacial de Minas Gerais com a região endêmica em destaque. Fonte: Guimaraes *et al.*, 2012. Disponível em <<https://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/a-study-of-schistosomiasis-prevalence-and-risk-of-snail-presence-spatial-distributions-using-geo-sta>>. Acesso em 28 de maio de 2018.

3.2 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O parasito da espécie *S. mansoni* possui um ciclo de vida complexo, o qual apresenta uma fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e uma de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (ser humano ou outros mamíferos). O ciclo de vida tem início quando os ovos são eliminados junto às fezes do hospedeiro vertebrado no meio aquático, liberando os miracídios, os quais irão penetrar nos moluscos. Os ovos eliminados juntamente com as fezes podem sobreviver de 2 a 5 dias em fezes de consistência sólida e 24 horas em fezes diarreicas. O contato com a água promove a dissolução das fezes e liberação dos ovos no meio líquido, provocando a eclosão e liberação das larvas ciliadas, os miracídios. Os miracídios nadam até encontrarem o caramujo, onde penetram através do tecido do mesmo; a partir desse ponto inicia-se a reprodução assexuada. Após etapas sucessivas de transformação, a larva passa a ser chamada esporocisto primário e, posteriormente, esporocisto secundário, nos quais as células germinativas multiplicam-se dando origem às cercárias de cauda bifurcada, após 25 a 30 dias

da infecção. As cercárias, liberadas pelos caramujos, nadam e podem entrar em contato com o hospedeiro, onde penetram ativamente pela pele e mucosas. O homem se infecta ao entrar em contato com águas contaminadas com as cercárias. A penetração da cercária na pele produz uma dermatite alérgica no local de entrada, podendo em alguns casos desenvolver um *rash* cutâneo. Durante a penetração na pele, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, os quais são transportados através dos vasos sanguíneos ou linfáticos para o lado direito do coração e depois para os pulmões. Através da circulação sistêmica, atingem o sistema porta hepático, onde ocorre a maturação dos vermes. Nas veias portais, os vermes adultos se acasalam, migram para veia mesentérica inferior, e a fêmea inicia a postura dos ovos de 4 a 6 semanas após a penetração cercariana. Parte desses ovos ganha a circulação e depositam-se em órgãos como o fígado, levando ao desenvolvimento de uma reação imunoinflamatória granulomatosa que resulta na formação dos granulomas, enquanto outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais produzindo granulomas, e parte destes alcançar a luz intestinal sendo eliminados junto as fezes, dando continuidade ao ciclo (Jenkins-Holick e Kaul, 2013) (Figura 4).

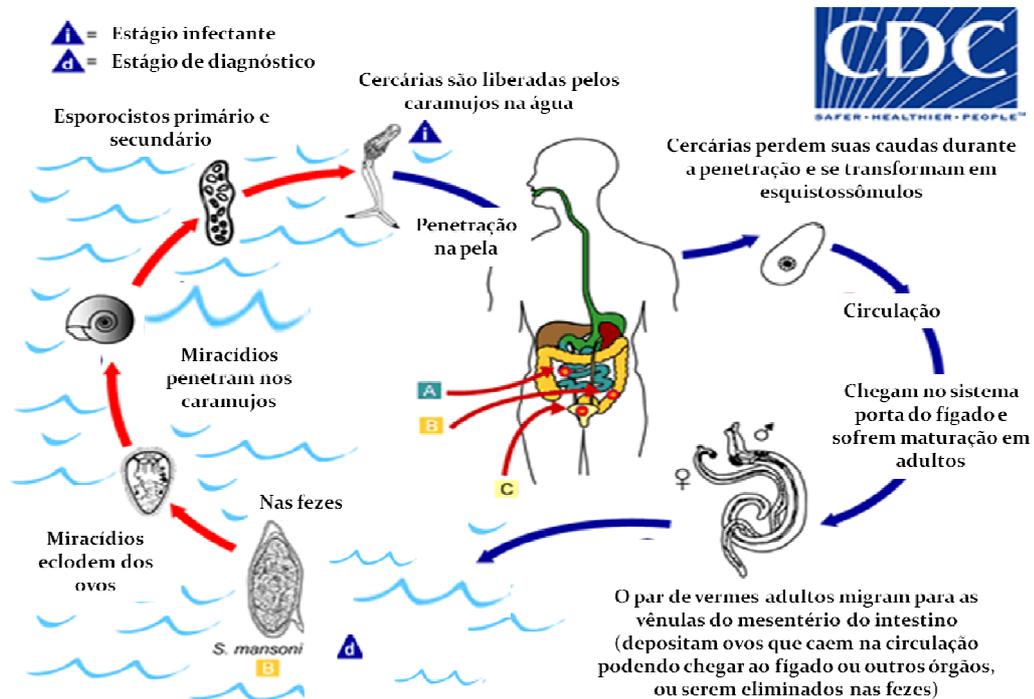


Figura 4: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. O esquema representa o complexo ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, evidenciando a fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e a fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado (homem). Fonte: adaptado de CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>.

3.3 Controle da esquistossomose mansoni

Os programas de controle da esquistossomose devem abranger múltiplos componentes como o tratamento dos indivíduos associado ao uso de moluscicidas, à educação e promoção da saúde, o melhoramento do saneamento básico e abastecimento de água, e a busca ativa de casos por meio de um diagnóstico sensível e seguro (Sarvel *et al.*, 2011; Rollinson *et al.*, 2013). Entretanto, essas medidas profiláticas são dificultadas pelo padrão socioeconômico precário dos países acometidos e a falta de interesse de políticas públicas. Programas focados na erradicação de espécies de caramujos não resultam em completa erradicação destes moluscos, além de ser uma abordagem difícil de ser sustentada, pois os moluscicida não tem ação específica contra as espécies, podendo ocasionar um desastre ecológico no ambiente aquático (Fenwick *et al.*, 2006). No Brasil, o uso de moluscicidas é limitado e usado em situações excepcionais (Coelho e Caldeira, 2016).

Uma das medidas mais utilizadas atualmente no controle da esquistossomose é o tratamento com PZQ. Os programas de controle adotados na África são focados no tratamento em massa da população enquanto no Brasil, o tratamento é realizado mediante o diagnóstico individual (Rollinson *et al.*, 2013; MS, 2014; WHO, 2016a). O PZQ é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma* e eficaz contra formas adultas do parasito, entretanto é pouco eficaz contra as formas imaturas (Silva-Moraes *et al.*, 2013). Essa falha terapêutica tem sido associada a infecções tardias provenientes de formas jovens que não são efetivamente eliminadas com o tratamento. O grande valor atribuído a esse fármaco está relacionado à sua baixa toxicidade e baixo custo, tornando-o medicamento de escolha pela OMS (WHO, 2016a).

O tratamento em massa sem diagnóstico prévio para controle da morbidade em áreas de alta prevalência tem sido conduzido na África. O objetivo delineado para 2030 é tratar mais de 75% das crianças e adolescentes que vivem em áreas endêmicas (WHO, 2016a). De acordo com a OMS, em áreas com endemicidade alta (prevalência > 50%), todas as crianças e adultos sob risco devem ser tratados anualmente. Em áreas de endemicidade moderada (prevalência 10-50%), todas as crianças em idade escolar devem ser tratadas uma vez a cada dois anos. Em áreas de endemicidade baixa (prevalência <10%), crianças em idade escolar devem ser tratadas duas vezes durante o período escolar; no primeiro e último ano (WHO, 2012b). Entretanto, existem certas falhas e críticas para este tipo de intervenção, tais como dificuldades logísticas e financeiras e a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao

medicamento. Nos países africanos a empresa Merck oferece suporte financeiro na distribuição de PZQ (Colley, 2014; WHO/PAHO, 2014).

No Brasil o tratamento em massa não é recomendado fazendo do diagnóstico uma das medidas mais importantes no controle da doença no país. O tratamento em massa sem diagnóstico prévio é considerado uma conduta inapropriada e com efeito transitório nos indicadores da doença (Favre, 2012). São realizados inquéritos coproparasitológicos, com subsequente tratamento com PZQ dos indivíduos positivos. O PZQ é produzido pela Farmanguinhos (Fiocruz) e distribuído pelo Ministério da Saúde sem custo a população o que amplia mais a adesão ao tratamento (MS, 2014). Para atender as metas de eliminação da resolução WHA65.21, o Ministério da Saúde adotou um plano de ação em 222 municípios em 9 estados endêmicos do Brasil. A estratégia de diagnóstico e tratamento foi baseada da seguinte forma: avaliação anual com tratamento de toda a população para áreas com prevalência $\geq 50\%$; avaliação bienal com tratamento dos casos positivos e moradores da mesma residência para áreas entre 25-50% de prevalência; avaliação bienal com tratamento dos casos positivos para áreas entre 5-25% de prevalência; e busca passiva de casos e tratamento específico para áreas $< 5\%$ (Favre, 2012; MS, 2014; Favre *et al.*, 2015). Estas atividades são registradas no Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE). Em áreas não endêmicas, a notificação é compulsória no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Embora O PZQ esteja disponível e tenha contribuído para a redução da morbidade, apenas 20,7% da população global que necessita de tratamento foi medicada em 2014 (WHO, 2016c). Existe ainda um grande número de reinfecções em áreas endêmicas e propagação da doença para novas áreas, o que demonstra que este método não tem obtido sucesso no controle da transmissão (Kittur *et al.*, 2017). Alguns estudos vêm abordando a incorporação de vacinas nos programas de controle da esquistossomose em associação com o tratamento ou como um método isolado. Até o momento não existe uma vacina disponível contra a esquistossomose. Isso se deve principalmente à complexidade do parasito e a um conhecimento incompleto dos mecanismos imunológicos do hospedeiro capaz de eliminar a infecção (Alsallaq *et al.*, 2017).

O diagnóstico apresenta importante papel no controle da esquistossomose, principalmente em áreas que alcançaram o controle da morbidade e as cargas parasitárias foram reduzidas (WHO, 2012a; Gomes *et al.*, 2014). Nos últimos anos, estudos apontaram que a prevalência da esquistossomose está sendo subestimada devido à falta de sensibilidade do método de K-K no diagnóstico de infecções de baixa intensidade (Enk, Lima, *et al.*, 2008;

Siqueira *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016). As ações adotadas dentro dos programas de controle são conduzidas de acordo com os dados de prevalência, de modo que a subestimação da prevalência pode conseqüentemente diminuir a abrangência do tratamento e retardar a eliminação da doença. O diagnóstico acurado fornece resultados seguros permitindo o tratamento adequado dos indivíduos. Isso impede a evolução para formas graves e bloqueia a eliminação de ovos, contribuindo dessa forma para a interrupção da transmissão através da interrupção do ciclo (Enk, Lima, *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2014; Utzinger *et al.*, 2015).

A desigualdade social e a não eliminação da condição de pobreza são os fatores principais relacionados à permanência da transmissão da doença no Brasil (Katz, 2018). Ao lado do diagnóstico acurado e do tratamento, o investimento em saneamento básico é ressaltado como grande prioridade sobre a eliminação da esquistossomose e demais doenças relevantes para saúde pública. Políticas públicas voltadas para a educação em saúde e melhoria do abastecimento de água requerem um ritmo mais intenso do que o observado nos últimos anos (Katz, 2018). Outros fatores que podem ser mencionados são os hábitos de vida (recreação, pesca e agricultura), ecoturismo, migração interna de pessoas infectadas, disseminação dos hospedeiros intermediários, o clima tropical e a inexistência de uma vacina eficaz (Enk, Amaral, *et al.*, 2010; Enk, Lima, *et al.*, 2010; Utzinger *et al.*, 2010; Rollinson *et al.*, 2013).

3.4 Imunopatologia da esquistossomose mansoni

A sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro e varia dependendo da carga parasitária e da resposta imunológica do indivíduo. A esquistossomose pode se apresentar sob forma aguda ou forma crônica, a diferença das formas é em relação às manifestações clínicas e imunológicas (Barsoum *et al.*, 2013; Colley e Secor, 2014).

A fase aguda (ou inicial) é detectada, normalmente, em indivíduos não residentes de áreas endêmicas, que entram em contato com águas contaminadas por cercárias de *S. mansoni* pela primeira vez, como por exemplo, viagens de turismo. A fase aguda inicia-se com a penetração das cercárias através da pele do hospedeiro definitivo, seguida da migração de esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro humano e início da oviposição (Haas *et al.*, 1997). A resposta do sistema imune do hospedeiro definitivo contra o *S. mansoni* inicia-se com a penetração das cercárias na pele. As cercárias liberam diversas moléculas

imunogênicas por meio da secreção das glândulas acetabulares, que auxiliam no processo de penetração e na transformação em esquistossômulos (Haas *et al.*, 1997). A resposta é inicialmente inata durante essa fase de invasão, seguida por uma resposta imune adaptativa tipo Th1 dominante, poucos dias depois. A partir do amadurecimento dos parasitos, por volta da sexta semana, começa a produção de ovos e a resposta imune do tipo Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6), característica do início da infecção, começa a declinar, enquanto a resposta do tipo Th2 (IL-4, IL-13, IL-5, IL-10) aumenta (Burke *et al.*, 2009).

Os sinais e sintomas exibidos durante essa fase estão associados à carga parasitária e ao desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada. Os sintomas mais comuns são febre, mal-estar, diarreia, vômitos, anorexia, cefaleia, dor abdominal, perda de peso, tosse seca, acompanhados por eosinofilia acentuada e leucocitose (Lambertucci, 2010). Algumas destas manifestações podem surgir alguns dias após a exposição cercariana ou, mais frequentemente, cerca de um mês depois, coincidindo com o começo da eliminação de ovos nas fezes. Os quadros agudos podem também ser assintomáticos, e paradoxalmente, desencadear um quadro invasivo com distribuição sistêmica de ovos. A fase crônica se instala aproximadamente após quatro meses (Rabello, 1995).

A grande maioria dos indivíduos residentes em área endêmica são portadores da infecção crônica. Esse quadro está associado à formação dos granulomas nos tecidos de diferentes órgãos, como intestino, fígado, baço e até mesmo o sistema nervoso central (Bina e Prata, 2003). O granuloma é uma consequência da reação inflamatória aos ovos que não foram excretados nas fezes e ficam retidos no parênquima hepático e nos tecidos do hospedeiro. A presença dos ovos no organismo do hospedeiro induz a formação de reação inflamatória focal, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e uma expressão aumentada das citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e IL-10 (Burke *et al.*, 2009; Hams *et al.*, 2013). Candido e colaboradores (2017) demonstraram que os antígenos solúveis liberados pelos poros dos ovos de *S. mansoni* são os maiores responsáveis pela indução da resposta imune no hospedeiro. Experimentos em camundongos demonstraram uma significativa resposta humoral após 58 dias de imunização com ovos sonicados enquanto que essa diferença não foi observada quando ovos intactos foram inoculados (Candido *et al.*, 2017).

A fase crônica da esquistossomose é caracterizada pela imunomodulação do granuloma geralmente acompanhada por uma redução da produção de citocinas do tipo Th2 e Th1 (Barsoum *et al.*, 2013). A produção de IL-10 diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias modulando a infecção. A reação inflamatória relacionada ao granuloma e uma

prolongada produção de IL-4 e IL-13 contribui para inflamação no fígado e fibrose levando a morbidade associada à fase crônica (Wynn e Barron, 2010). Entretanto, o granuloma também é benéfico uma vez que “sequestra” os antígenos liberados pelos ovos, os quais apresentam efeito hepatotóxico. Isso permite a sobrevivência do hospedeiro protegendo-o contra uma resposta imunológica exacerbada (Hams *et al.*, 2013). Wilson e colaboradores (2014) demonstraram que o nível de citocinas do tipo 2 estimuladas por meio dos antígenos solúveis do ovo aumentam 1 e 2 anos após o tratamento em relação a fase pré tratamento em uma análise realizada em crianças de uma área endêmica. Ao contrário disso, as citocinas proinflamatórias estão aumentadas antes do tratamento e diminuem após o período do tratamento (Wilson *et al.*, 2014).

Mais de 90% dos residentes de área endêmica desenvolvem a forma crônica branda, sendo esta considerada a forma intestinal e muitas das vezes assintomática. A forma crônica branda geralmente é caracterizada pela baixa carga parasitária dos indivíduos e reação inflamatória granulomatosa de menor intensidade no fígado e intestino. Os sintomas mais comuns da forma intestinal são dores abdominais crônicas ou intermitentes, perda de apetite e diarreia. Uma pequena porcentagem evolui para as formas crônicas mais graves; hepatointestinal e hepatoesplênica (Caldas *et al.*, 2008). As formas hepáticas estão associadas a uma infecção duradoura, de alta intensidade, com fibrose grave e com consequente oclusão de veias portas, hipertensão-portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes gastrointestinais podendo levar a morte (Caldas *et al.*, 2008). As lesões do sistema nervoso central são devido à localização ectópica dos ovos, sendo a radiculomielopatia esquistossomótica a forma mais grave (Ferrari e Moreira, 2011).

Os fatores que determinam o aparecimento das diferentes manifestações clínicas ainda não estão completamente elucidados. É de conhecimento que uma alta carga parasitária está diretamente relacionada ao aparecimento de formas clínicas mais graves da doença e que pode favorecer o desenvolvimento da forma hepatoesplênica da doença (Bina e Prata, 2003). Porém, a intensidade da infecção não é o único fator responsável por determinar a gravidade da doença, já que em áreas hiperendêmicas a porcentagem de indivíduos com formas graves é pequena (Bina e Prata, 2003). No Brasil a maioria das pessoas com esquistossomose não apresentam as formas graves da doença devido aos programas de controle implementados ao longo dos anos. São comuns lesões mais brandas, porém não menos significativas, com problemas de crescimento, anemia, dor abdominal, intolerância a exercícios, baixo desempenho escolar e reduzida capacidade de trabalhar (Rollinson *et al.*, 2013).

O papel biológico das imunoglobulinas na esquistossomose é bastante complexo e continua sendo alvo de estudos. Existem evidências de que as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade do indivíduo, estado nutricional, intensidade e tempo de infecção, como também com a presença de reinfecções (Oliveira *et al.*, 2004). No início da infecção pelo *S. mansoni*, ocorre a ativação do sistema complemento, inicialmente através da via alternativa e produção de anticorpos específicos das classes IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA. Na fase crônica são descritos altos títulos dos anticorpos IgG1, IgE e IgG4 (Pearce e Macdonald, 2002; Caldas *et al.*, 2008). A citocina IL-4, secretada pelas células Th2, induz as células B a secretarem IgG1 e IgE. Já os altos níveis de IgG1 podem estar relacionados com a síntese de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (Silva *et al.*, 2004). A produção dos anticorpos IgE e IgG4 depende, inicialmente, de IL-4 ou IL-13 produzidos por células Th2. E essas imunoglobulinas demonstram estar relacionadas respectivamente a resistência e susceptibilidade de indivíduos em áreas endêmicas, onde as reinfecções são constantes (Caldas *et al.*, 2008).

3.5 Diagnósticos disponíveis

Atualmente, existem diferentes metodologias disponíveis para o diagnóstico da esquistossomose. Entre elas estão os métodos coproparasitológicos, os imunológicos e moleculares. Mesmo com muitos esforços de diversos institutos de pesquisas e pequenas empresas no desenvolvimento de ferramentas com alto desempenho no diagnóstico, nenhuma destas faz parte das diretrizes da OMS. A técnica de K-K permanece como a única técnica padronizada pela OMS no controle da esquistossomose, adotada desde 1985 (Katz *et al.*, 1972; WHO, 2012a). Durante os programas de controle de morbidade, os quais tem como objetivo a redução de prevalências altas (>50%) e moderadas (20-50%) para prevalências menores que 1%, K-K possui um desempenho satisfatório. Quando os programas alcançam o nível de eliminação como o foco principal, essa técnica não é compatível devido à baixa sensibilidade em detectar indivíduos com baixa carga parasitária, os quais retratam a maioria da população acometida atualmente (Lim *et al.*, 2018).

Estudos recentes conceituaram quatro fases durante os programas de controle nos quais a acurácia do diagnóstico se faz uma exigência para alcançar o objetivo final de eliminação da doença como um problema de saúde pública: fase inicial de mapeamento das áreas a fim de determinar a prevalência e identificar as estratégias de controle (*use-case 1*);

fase de monitoramento do progresso das estratégias adotadas (*use-case 2*); fase de confirmação da interrupção da transmissão (*use-case 3*) e fase de vigilância epidemiológica para verificar a sustentabilidade após a interrupção da transmissão (*use-case 4*) (Lim *et al.*, 2018). Essas etapas estão representadas na figura 5. Os autores enfatizam que a proposta de um novo teste deveria atender essas quatro fases isoladamente ou combinadas (Solomon *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2018).

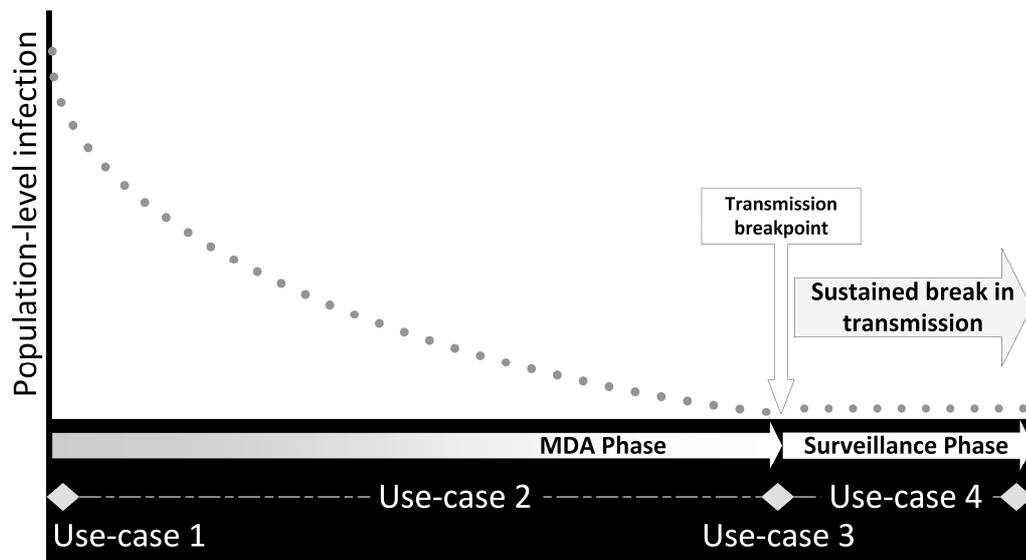


Figura 5: Definição das fases dos programas de controle direcionados a eliminação da esquistossomose.
Fonte (Lim *et al.*, 2018)

3.5.1 Métodos parasitológicos

Os exames parasitológicos de fezes são muito utilizados por permitirem a visualização microscópica do parasito (ovo). A demonstração direta constitui método de diagnóstico de certeza, o que inclui um valor significativo a essas análises. Embora exames parasitológicos negativos não indiquem a ausência da doença, levando em consideração os indivíduos em fase pré-patente e aqueles com baixa eliminação de ovos, esses testes ainda são muito utilizados pelo baixo custo e sua praticidade em áreas com infraestrutura precária (Enk, Lima, *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2018).

Os exames parasitológicos se dividem em análises qualitativas e quantitativas. Os métodos qualitativos caracterizam-se pela capacidade de identificação dos tipos de parasitos que o indivíduo possui sem realizar a quantificação da carga parasitária. Dentre estes estão os

métodos de Sedimentação Espontânea (Hoffmann *et al.*, 1934) e o Centrífugo-sedimentação (MIFC) ou método de Blagg (Blagg *et al.*, 1955). Essas técnicas são utilizadas na rotina laboratorial, pois permitem a pesquisa de vários parasitos intestinais a um baixo custo e simplicidade operacional.

Os métodos quantitativos possuem a capacidade de determinar a quantidade de ovos eliminados por grama de fezes. Isso permite estimar a intensidade da infecção, que é um indicador da endemicidade da área de estudo (WHO, 2011). Dentre estes se destacam os métodos K-K (Katz *et al.*, 1972), Gradiente Salino (GS) (Coelho, Jurberg, *et al.*, 2009), Helmintex (Fagundes Teixeira *et al.*, 2007) e o mais recentemente introduzido Mini-FLOTAC (Barda, B. D. *et al.*, 2013). A biópsia também é realizada para a percepção de ovos nos tecidos, porém caracteriza um método invasivo e pouco utilizado na prática clínica, a não ser em poucos casos onde a patologia atingiu pontos críticos para a saúde do paciente e os resultados obtidos precisam ser confirmados por outras técnicas (Rabello *et al.*, 1992).

Kato-Katz

O exame parasitológico de fezes K-K é um método qualitativo e quantitativo, consistindo na identificação e quantificação do número de ovos nas fezes (Katz *et al.*, 1972). A técnica de Kato & Miura (1954), tornou-se internacionalmente conhecida em 1966 e foi posteriormente modificada por Katz e colaboradores (1972). As lâminas são confeccionadas através de uma placa de plástico contendo um orifício central de 6 mm de diâmetro, na qual é adicionada uma quantidade de fezes ($41,7 \pm 2,0$ mg) filtrada por meio de uma tela de plástico. O K-K continua sendo o método de referência adotado pela OMS, devido à sua simplicidade, especificidade, acurácia e praticidade em situações de infraestrutura laboratorial precária e baixo custo operacional (Carneiro *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2015).

O método de K-K é capaz de diagnosticar com precisão infecções moderadas e intensas as quais as cargas parasitárias são altas (> 100 opg). Entretanto, isso não ocorre em infecções leves, quando as cargas parasitárias são baixas, como resultado dos programas de controle ao longo dos anos ou tratamentos em massa da população (De Vlas *et al.*, 1992; Enk, Lima, *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2015). As situações associadas à redução ou ausência de ovos nas fezes podem ser infecções recentes ou imaturas, infecções unissexuais, oviposição

parasitária inconstante, retenção de grande parte dos ovos no tecido devido à fibrose da mucosa e submucosa intestinal (Rabello, 1997).

Entre as alternativas para suprir essas limitações, estão o aumento do número de amostras (coletadas em dias diferentes), o aumento do número de lâminas analisadas e a combinação de mais de um teste parasitológico. Rabello e colaboradores (1992) sugeriram que o K-K (2 L) realizado a partir de três amostras coletadas em dias diferentes poderia ser uma alternativa para identificação de cargas parasitárias baixas (Rabello *et al.*, 1992). Os dados de Enk e colaboradores (2008) corroboraram com os anteriores, nos quais a prevalência obtida por K-K (1L/1A) foi de 13,8% enquanto que K-K (2 L) de cada uma das amostras coletadas em dias diferentes (6L/3A) foi de 25,9%. Além disso, quando o teste de centrífugo-sedimentação por formol-éter (FECT) foi combinado ao K-K, uma prevalência de 35,4% foi atingida (Enk, Lima, *et al.*, 2008). Embora as taxas de positividade aumentem com a análise de diferentes amostras, esse procedimento pode dificultar a logística nos programas de controle, sendo mais viável trabalhar com uma única amostra (Gomes *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2015).

Uma extensa avaliação tem sido realizada nas áreas de baixa endemicidade no norte de Minas Gerais (média = 5 opg) utilizando a técnica de K-K com 24 L provenientes de uma única amostra fecal. Siqueira e colaboradores (2015) demonstraram que a taxa de positividade aumentou de 8% para 14,4%, na análise 2 L e 12 L de K-K, respectivamente, da mesma amostra. Quando um teste comercial (TF-Test) foi adicionado ao estudo, a prevalência da área foi 35,8%. Esse valor representa 4,5 vezes mais que análise pelo método atualmente adotado pela OMS (K-K 2L/1A) na avaliação de casos (Siqueira *et al.*, 2015). Em uma área endêmica localizada próxima a descrita anteriormente, a taxa de positividade aumentou de 10,6% para 19,1% analisando 2 L e 24 L, respectivamente. Além disso, a adição da técnica de GS levou a prevalência de 24,1% (Siqueira *et al.*, 2016).

A preocupação em ter somente o K-K (2 L) como indicador de prevalência vem aumentando devido à subestimação dos dados reais, principalmente quando se quer saber se as intervenções de controle foram eficazes e se a área está próxima de eliminar a transmissão. Nas áreas sob sucessivos tratamentos, as cargas parasitárias caem e a morbidade é controlada, entretanto isso não significa a cura dos indivíduos. Um único casal de vermes adultos não eliminado durante o tratamento é capaz de manter a oviposição e dar continuidade a transmissão da doença.

Gradiente salínico

A técnica do GS foi criada com o objetivo de desenvolver uma ferramenta com alta sensibilidade e de simples execução no campo, constituindo uma alternativa para o K-K, atualmente padronizado (Coelho, Jurberg, *et al.*, 2009). O princípio desta técnica se baseia na alta densidade dos ovos de *S. mansoni* sedimentarem em gradiente de concentração de solução de cloreto de sódio (solução salina). Um procedimento de GS corresponde a 500 mg de fezes que equivalente a análise de 12 L de K-K. Essa quantidade de fezes é colocada sob um fluxo contínuo (20 min) de solução salina a 3% passando por uma placa porosa e promovendo a suspensão e a retirada de detritos de baixa densidade da amostra fecal que está diluída em solução salina a 0,9%. Os ovos de *S. mansoni* possuem alta densidade e permanecem na superfície da placa porosa acoplada a este fluxo. O sedimento contendo os ovos é adicionado em uma lâmina e analisado ao microscópio óptico. O aprimoramento da técnica nos últimos anos permitiu a preparação de até 12 amostras simultaneamente por hora equivalente a 144 L de K-K (12 L x 12 A) (Coelho, Jurberg, *et al.*, 2009) (Figura 6).

A técnica de GS possui como grande vantagem a redução no número final de lâminas por procedimento e conseqüentemente menor tempo da análise microscópica pelo técnico. Além disso, os ovos mantidos em formol a 10% mantem sua morfologia intacta por meses e são facilmente identificados, ao contrário do que ocorre com a técnica de K-K, que preserva apenas o contorno externo dos ovos (Coelho, Jurberg, *et al.*, 2009). O GS é uma técnica de baixo custo, de execução fácil e rápida em populações com até 350 indivíduos. Coelho e colaboradores vêm utilizando essa técnica combinada ao K-K (24 L) como teste de referência na determinação da prevalência em áreas de baixa endemicidade no norte de Minas Gerais (Coelho *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2016; Grenfell *et al.*, 2018). Coelho e colaboradores (2009) demonstraram que esta técnica, examinando-se 500 mg de fezes, apresentou maior sensibilidade que 12 L de K-K (12 x 41,7 mg ~ 500 mg) de uma única amostra fecal (Coelho, Jurberg, *et al.*, 2009). Por outro lado, Oliveira e colaboradores (2018) demonstraram que empregando 500 mg de fezes a prevalência por K-K (30,3%) foi superior a análise do GS (21,3%) (Oliveira *et al.*, 2018).



Figura 6. Aparelho da técnica do Gradiente Salínico. Fonte: (Coelho, Jurberg, *et al.*, 2009) e do arquivo da autora.

Outras alternativas parasitológicas

O Helmintex é uma técnica que vem demonstrando alta sensibilidade devido a grande quantidade de amostra fecal analisada. Ele baseia-se na análise de 30g de uma amostra fecal, a qual é submetida a repetidos processos de filtração e sedimentação e, posteriormente, combinada com esferas paramagnéticas (Fagundes Teixeira *et al.*, 2007). Deste modo, a amostra torna-se mais límpida, o que facilita a leitura em microscopia ótica. Pinheiro e colaboradores (2012) observaram uma prevalência de 47,1% pelo Helmintex contra 8,75% pelo K-K (2 L) e 18% do GS (500 mg) (Pinheiro *et al.*, 2012). Subsequentemente, Oliveira e colaboradores (2018) determinaram prevalências de 40,4%, 20,43% e 21,32% utilizando as mesmas técnicas, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2018). Apesar de possuir sensibilidade superior ao K-K (2 L) principalmente em indivíduos com carga parasitária baixa, esse método é inadequado tanto para a atividade de campo quanto para a realização de exames rotineiros. Sua recomendação seria estrita a um instrumento final de rastreamento na execução de algum algoritmo (avaliação de riscos, análise de K-K, sorologia e análise Helmintex) e como teste de referência na avaliação de desempenho de novos métodos (Oliveira *et al.*, 2018).

O Mini-FLOTAC foi recentemente introduzido e é baseado numa modificação do FLOTAC, que foi testado primeiramente na detecção de helmintoses em animais e, subsequentemente, validado em humanos (Barda, B. D. *et al.*, 2013). O princípio é a homogeneização das fezes em formalina, seguido da filtração para remoção dos *debris* e adição de uma solução de flutuação com gravidade específica (cloreto de sódio e sulfato de

zinco). São esperados cerca de 10 min para que os ovos flutuem e o material possa ser transferido para lâminas e visualização no microscópio. Em uma das suas primeiras aplicações em áreas endêmicas, esse método detectou um número maior de infecções por *S. mansoni* (49%) em comparação ao K-K (33%), porém com baixa concordância (Kappa = 0,53) (Barda, B. *et al.*, 2013). Uma das vantagens do Mini-FLOTAC é a análise de fezes fixadas em formalina armazenadas em até três meses com sensibilidade comparável ao K-K (2 L) preparado de amostras frescas (89,2% e 95,9%, respectivamente) (Coulibaly *et al.*, 2016). No Brasil esse método foi empregado somente na detecção veterinária (Lima *et al.*, 2015).

3.5.2 Métodos imunológicos

O sistema imune elucida uma resposta específica a diferentes antígenos do parasito permitindo a manipulação da identificação da reação antígeno-anticorpo em diferentes imunoenaios. As técnicas são baseadas na detecção de anticorpos (indireta) e de antígenos (direta). Esses testes podem ter diferentes sensibilidades e especificidades dependendo da metodologia empregada e da população estudada (Doenhoff *et al.*, 2004). A detecção de anticorpos possui alta sensibilidade e tem sido empregada na detecção de indivíduos de área não endêmica recém-expostos a área de transmissão (Van Gool *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2012; Lambertucci *et al.*, 2013; Infurnari *et al.*, 2017), e como método adicional as técnicas parasitológicas na detecção de indivíduos de áreas de baixa endemicidade (Kanamura *et al.*, 1998; Da Frota *et al.*, 2011; Espirito-Santo *et al.*, 2014). A detecção de antígenos se destaca da detecção de anticorpos devido à sua maior especificidade. O uso de anticorpos monoclonais aliado a essas técnicas podem diferenciar infecções atuais de infecções passadas e, potencialmente, estimar a intensidade de infecção, se aproximando mais das técnicas parasitológicas (Van Lieshout *et al.*, 2000; Van Dam *et al.*, 2004; Grenfell *et al.*, 2014). O ELISA, o qual tem sido adaptado para tiras imunocromatográficas disponível em cassetes no formato *point-of-care* (POC), são os testes mais empregados atualmente (Hinz *et al.*, 2017).

Detecção de anticorpos

A detecção sorológica de anticorpos anti-*Schistosoma* em amostras humanas determina se um indivíduo foi previamente exposto ao parasito. Na maioria dos casos, os anticorpos se desenvolvem 6-8 semanas depois da infecção e podem ser identificados no soro antes que ovos sejam detectados na urina ou fezes, o que determina sua alta sensibilidade (Hinz *et al.*, 2017). As metodologias baseadas na identificação de anticorpos têm sido empregadas, principalmente na detecção de indivíduos com coproscopia negativa (Kanamura *et al.*, 1998; Van Gool *et al.*, 2002; Da Frola *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Lambertucci *et al.*, 2013; Espirito-Santo *et al.*, 2014; Infurnari *et al.*, 2017). As maiores aplicações destes testes estão relacionadas a indivíduos sintomáticos de áreas não endêmicas com histórico de contato em algum foco de transmissão (fase pré-patente ou aguda), ao mapeamento de áreas sob risco de infecção e à identificação de indivíduos com baixas cargas parasitárias (até 1 opg) (Noya *et al.*, 2002; Lambertucci *et al.*, 2013; Espirito-Santo *et al.*, 2014).

Dentre as desvantagens da detecção indireta como ferramenta diagnóstica está a falta de indicação da intensidade da infecção (baixa correlação entre a titulação e anticorpos e a carga parasitária), à ocorrência de reações cruzadas com outros helmintos (os helmintos compartilham muitos antígenos semelhantes) e a não detecção da infecção ativa (indivíduos tratados e curados permanecem com anticorpos circulantes após o tratamento) (Doenhoff *et al.*, 2003; Doenhoff *et al.*, 2004; Grenfell, Silva-Moraes, *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2014; Kalenda *et al.*, 2015; Cosenza *et al.*, 2017).

Existem várias técnicas disponíveis para identificar o complexo antígeno-anticorpo, mas poucas alcançaram as etapas de validação do desenvolvimento (Corstjens *et al.*, 2014; Utzinger *et al.*, 2015). Atualmente, o ELISA é o teste mais frequentemente usado para sorologia, oferecendo a opção de detectar diferentes classes de anticorpos, bem como usar uma ampla gama de antígenos. Antígenos brutos (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e antígenos de ovos), proteínas purificadas e recombinantes, antígenos circulantes e peptídeos sintéticos têm sido amplamente utilizados (Kinkel *et al.*, 2012; Hinz *et al.*, 2017). Para ganhar acessibilidade às áreas de campo e com poucos recursos, os ensaios de ELISA têm sido transformados em testes rápidos disponíveis em tiras imunocromatográficas no formato POC (Mabey *et al.*, 2004; Corstjens *et al.*, 2014; Nausch *et al.*, 2014).

Dentre as aplicações da sorologia indireta, está o monitoramento de indivíduos que entraram em contato com áreas endêmicas e que não possuíam histórico de exposição ao

parasito (Coelho, Enk, *et al.*, 2009; Enk, Amaral, *et al.*, 2010; Enk, Lima, *et al.*, 2010). Esses indivíduos podem desenvolver infecções agudas que são assintomáticas ou apresentam sintomas inespecíficos, de modo que o exame clínico e a microscopia do ovo por si só não atingem a sensibilidade satisfatória (Coelho, Enk, *et al.*, 2009). Na prática clínica de atenção primária a saúde, sorologia positiva com K-K negativo é geralmente suficiente para prescrever o tratamento com PZQ (Van Gool *et al.*, 2002; Lambertucci *et al.*, 2013).

Padronizações do ELISA com extratos de formas jovens têm demonstrado resultados significativos na detecção na fase inicial da doença. Na identificação da infecção crônica, o antígeno solúvel de cercárias demonstraram uma moderada sensibilidade e alta especificidade quando empregado na detecção de anticorpos (86,6% e 94,11%, respectivamente) (Sarhan *et al.*, 2014). Na detecção de casos importados, ou seja de indivíduos de áreas não endêmicas, a sensibilidade foi baixa e a especificidade foi alta (47,6 e 95,2%, respectivamente) (Kinkel *et al.*, 2012). Grenfell e colaboradores (2013) demonstraram a detecção de anticorpos no ELISA utilizando extrato solúveis de verme (SWAP) e esquistossômulos recém-transformados (SmTeg) de *S. mansoni*. Nessa análise, o IgG-ELISA-SWAP foi um dos critérios utilizados para fornecer o diagnóstico e tratar indivíduos expostos a uma lagoa contaminada na cidade histórica de São João Del Rei, Minas Gerais. O teste de IgG-ELISA-SmTeg mostrou maior taxa de positividade (80%) comparado ao SWAP (56%) nesse grupo (Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013; Lambertucci *et al.*, 2013).

Uma alternativa para identificação de infecções recentes seria a incorporação de multi-isotipos de imunoglobulinas (Ig G/A/M/E) (Valli *et al.*, 1997; Kanamura *et al.*, 1998). Rabello e colaboradores (1995) demonstraram que a detecção de IgA-ELISA contra antígenos solúveis de ovo (SEA) é uma boa alternativa para diferenciar a infecção aguda e crônica por *S. mansoni* quando os isotipos de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG) foram determinados (Rabello, 1995). Um estudo subsequente semelhante confirmou o potencial de IgA e IgM-ELISA contra SWAP no diagnóstico de casos agudos (Valli *et al.*, 1997).

Indivíduos residentes de área com transmissão são expostos o tempo todo a antígenos do parasito possuindo altos títulos de anticorpos sem estarem infectados. Da mesma forma, pacientes tratados não são diferenciados daqueles com infecção ativa, uma vez que os títulos de anticorpos permanecem altos por um período de meses após a cura (Doenhoff *et al.*, 2004). Mesmo não constituindo métodos isolados, a detecção de anticorpos podem ser ferramentas auxiliares aos métodos parasitológicos convencionais na busca de casos em áreas sob risco de transmissão e áreas de baixa endemicidade. A detecção de anticorpos contra antígenos de verme e ovo são os mais utilizados, pois apresentam uma boa sensibilidade e diminuem os

casos falso negativos ocorridos quando poucas lâminas K-K são aplicadas (Kanamura *et al.*, 1998; Noya *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005; Noya *et al.*, 2006; Da Frota *et al.*, 2011; Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013). Espírito-Santo e colaboradores (2015) sugeriram o uso de IgG e IgM-ELISA como ferramentas de mapeamento de prevalência seguidos de sucessivos análises parasitológicas e moleculares em áreas de baixa endemicidade (Espírito-Santo *et al.*, 2015). Grenfell e colaboradores (2013) mostraram a forte correlação de IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP quando comparado a um teste parasitológico de referência na identificação de indivíduos de uma área de baixa endemicidade (Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013).

Apesar da abundância antigênica dos extratos totais dos parasitos e alta sensibilidade na detecção de anticorpos, a especificidade é geralmente baixa devido à reatividade cruzada com infecções por outros helmintos (Doenhoff *et al.*, 2004; Boukli *et al.*, 2011). Estudos têm abordado o uso de antígenos circulantes, frações purificadas das formas evolutivas de *S. mansoni*, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos com o objetivo de aumentar a especificidade dos testes indiretos (Hinz *et al.*, 2017). A detecção de anticorpos contra o antígeno catódico circulante recombinante (CCAr) no teste de imunoseparação (IMS) demonstrou 100% de sensibilidade e 96% de especificidade empregando soros de indivíduos de uma área de baixa endemicidade do Brasil identificados por K-K (18 L) e soros de área não endêmica (Grenfell, R., Harn, D. A., *et al.*, 2013). Além disso, o IMS utilizando o CCA purificado determinou 90% de sensibilidade e 92% de especificidade na avaliação após tratamento. A proteína recombinante de 200-kDa (rSm200) do tegumento de *S. mansoni* demonstrou 90% de sensibilidade e 93,3% de especificidade no IgG-ELISA com forte correlação com a carga parasitária em residentes da área endêmica anterior e residentes não endêmicos (Carvalho *et al.*, 2014). Subsequentemente, ainda com as amostras provenientes dessas áreas, Carvalho e colaboradores (2017) apresentou o desempenho de um peptídeo sintético (n 5) com 96,15% de sensibilidade e 100% de especificidade no IgG-ELISA (Carvalho *et al.*, 2017). Oliveira e colaboradores (2008) utilizaram um *pool* de peptídeos sintéticos no IgG-ELISA utilizando soros de pacientes com baixa carga parasitária e indivíduos saudáveis demonstrando uma sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,2% (De Oliveira *et al.*, 2008).

Detecção de antígenos

A sorologia direta, baseada na detecção de antígenos, possui vantagens significativas comparadas às técnicas indiretas, como especificidade, correlação positiva com a carga parasitária e, principalmente, determinação da infecção ativa (Van Lieshout *et al.*, 2000; Van Dam *et al.*, 2004; Stothard *et al.*, 2011; Grenfell *et al.*, 2014). Os antígenos catódicos e anódico circulantes, CCA e CAA, respectivamente, têm sido os mais investigados (De Jonge *et al.*, 1990). Eles são derivados do epitélio do sistema digestivo do parasito e eliminados durante a regurgitação do sangue ingerido na circulação sanguínea do hospedeiro (Deelder *et al.*, 1994; Van Dam *et al.*, 1994). Dessa maneira, eles vêm demonstrando capacidade de indicar infecção ativa e servirem no monitoramento da cura, uma vez que seus níveis desaparecem poucos dias após o tratamento. Esses antígenos podem ser usados para determinação da intensidade de infecção, uma vez que estudos apontam a correlação com a contagem de ovos (Van Lieshout *et al.*, 1993; Van Dam *et al.*, 1994; Van Dam *et al.*, 1996; Van Dam *et al.*, 2004).

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais possibilitou a busca de antígenos circulantes específicos do parasito em diferentes tipos de amostras. O ELISA para captura direta desses antígenos em área com prevalência moderada e alta mostrou alta correlação com a contagem de ovos (Deelder *et al.*, 1994; Agnew *et al.*, 1995). Um estudo realizado no Brasil avaliou a detecção de CCA por ELISA no soro de indivíduos com baixa carga parasitária e indivíduos saudáveis. O teste apresentou 92% de sensibilidade e 100% de especificidade, respectivamente, comparado à análise do K-K (16L/3A). A detecção de CCA pela técnica de IMS demonstrou uma forte correlação com a carga parasitária. Quando o anti-CCA marcado com um fluorocromo foi utilizado na técnica de IMS, 83% de sensibilidade após o tratamento foi alcançada (Grenfell *et al.*, 2014). Anticorpos produzidos contra peptídeos sintéticos do antígeno circulante Sm31 foram produzidos e demonstraram um bom desempenho na identificação de indivíduos com baixa intensidade de infecção (70,8% e 80,5%) (Sulbaran *et al.*, 2010).

Diante do desempenho satisfatório no ELISA, os antígenos circulantes CCA e CAA foram adaptados para o formato RDT e denominados *up-converting phosphor-lateral flow circulating anodic antigen* (UCP-LF CAA) e *point-of-care circulating cathodic antigen* (POC-CCA®) (Corstjens *et al.*, 2008; Colley *et al.*, 2013). Estes testes permitem o uso de

amostras obtidas de maneira não invasivas, como urina, a fim de constituírem testes rápidos e de fácil aplicação nas áreas.

O método UCP-LF CAA possui uma significativa sensibilidade sendo capaz de detectar infecções de apenas um par de vermes em amostras de soro (SCAA500) e urina (UCAA2000) (Corstjens *et al.*, 2014). O SCAA500 apresentou um limite de detecção de 0,5 pg/mL de CAA, 10 vezes mais que o ELISA (10 pg/mL) (Corstjens *et al.*, 2008). As análises em amostras de soro e urina foram capazes de estimar a intensidade da infecção devido à boa correlação com a contagem de ovos (Corstjens *et al.*, 2008; Coulibaly *et al.*, 2011; Van Dam *et al.*, 2013; Corstjens *et al.*, 2014; Corstjens *et al.*, 2015; Corstjens *et al.*, 2017). O UCP-LF CAA é disponível em formato *dry reagent*, estável à temperatura ambiente e passível de ser transportado para qualquer lugar do mundo sem refrigeração (Van Dam *et al.*, 2013). Entretanto, essa técnica ainda não possui a total praticidade para uso em áreas de campo e, com isso, ainda não está disponível comercialmente. Primeiro, as amostras precisam de um tratamento prévio com ácido tricloroacético (TCA) seguido de centrifugação. A precipitação com TCA permite a disponibilidade da porção glicídica, alvo no sobrenadante. Segundo, as amostras devem ser combinadas através de filtros de centrifugação de 10 kDa (Corstjens *et al.*, 2015). Embora, esses dois passos adicionais não permitam que o UCP-LF CAA entre no conceito *point-of-care* ou *test-and-treat*, pois necessitam de uma minicentrífuga e termoshaker para execução, eles são essenciais para manutenção da sensibilidade e um bom desempenho do teste, principalmente em áreas de baixa endemicidade (Corstjens *et al.*, 2017).

O POC-CCA® está disponível comercialmente desde 2008 e seu desempenho tem sido avaliado com o objetivo de fazer parte dos programas de controle da esquistossomose (Van Dam *et al.*, 2004; Colley *et al.*, 2013). Ao contrário do UCP-LF CAA, ele é aplicável apenas a amostras de urina. Diante da sua praticidade, relacionada ao uso de amostras não invasivas, e resultado rápido (20 min), sem necessidade de qualquer equipamento, este ganhou rapidamente o mercado. POC-CCA® tem sido empregado em áreas endêmicas da África (baixa, moderada e alta prevalência) como ferramenta de triagem, indicador da prevalência, elaboração da MDA e avaliação de cura após tratamento (Coulibaly *et al.*, 2011; Shane *et al.*, 2011; Tchuem Tchuente *et al.*, 2012; Adriko *et al.*, 2014; Lamberton *et al.*, 2014; Mwinzi *et al.*, 2015; Kittur *et al.*, 2016; Colley *et al.*, 2017). Embora esse teste seja apontado como mais sensível que o K-K nessas áreas e seu uso seja incentivado, seus resultados ainda merecem maiores investigações, principalmente, em áreas de baixa endemicidade (Ochodo *et al.*, 2015). No Brasil, existem 10 trabalhos publicados e grandes divergências de resultados estão relacionadas: (1) à falta de um método de referência na avaliação de desempenho do

POC-CCA®, superestimando sua sensibilidade (Siqueira *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017; Marinho *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018), (2) a interpretação do traço como positivo, considerando as instruções do fabricante e levando a uma alta taxa de falso positivos (Coelho *et al.*, 2016; Grenfell *et al.*, 2018) e (3) a baixa sensibilidade na identificação de casos com baixas cargas parasitárias (Silveira *et al.*, 2016; Lindholz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

O emprego de um método parasitológico acurado como referência é necessário para a correta estimação da sensibilidade e especificidade do POC-CCA®. Siqueira e colaboradores (2016) adotaram um método de referência (K-K 24 L e 2 GS) na avaliação do POC-CCA® em área com indivíduos com baixa carga parasitária (média = 4,5 opg) (Siqueira *et al.*, 2016). A sensibilidade do POC-CCA® foi 86,6% e 73,5%, e especificidade 84,6% e 93,5%, quando comparado com K-K (2 L) e o teste de referência, respectivamente. Ferreira e colaboradores (2017) demonstraram que a sensibilidade do POC-CCA® foi 64,3%, 61,1%, 58,3%, 55,5% e especificidade 74,5%, 74,8%, 75% e 75,6% quando 1, 2, 4 e 6 lâminas de K-K foram analisadas, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2017). Esses dados mostraram como a sensibilidade do POC-CCA® cai quando uma robusta avaliação parasitológica é aplicada (Ferreira *et al.*, 2017). Siqueira e colaboradores (2016) demonstraram uma taxa de positividade de 24,1% e 22,6% pelo teste de referência e POC-CCA®, respectivamente, com Kappa = 0,80 (*substantial agreement*), considerando os traços positivos.

Por outro lado, Oliveira e colaboradores (2018), empregando um método de referência (K-K 18 L, 1 GS e Helmintex), estimaram prevalências aproximadas de 45,9% e 47,4% pelo parasitológico e POC-CCA, respectivamente. Entretanto, um Kappa igual 0,34 (*fair agreement*) entre os métodos foi encontrada quando os traços foram considerados positivos. Nessa análise, POC-CCA® estimou 35 falso positivos e 39 falso negativos dos quais possuíam < 12 opg (Oliveira *et al.*, 2018). Esses dados mostram a baixa sensibilidade de POC-CCA quando comparado a um padrão de referência, uma vez que demonstraram um número significativo de indivíduos não identificados com baixas cargas parasitárias. Lindholz e colaboradores (2018) mostraram um resultado similar no qual as prevalências do POC-CCA® e Helmintex (método de referência adotado) foram idênticas com 40,6%, mas com Kappa igual a 0,15 (*slight agreement*) quando os traços foram considerados positivos. Os números de resultados falso negativos e falso positivos foram 34 e 177, respectivamente (Lindholz *et al.*, 2018).

A sensibilidade e a especificidade do POC-CCA® também são influenciadas pela interpretação do traço como positivo ou negativo. As instruções do fabricante recomendam

considerar o traço como positivo por conceituar que ele representaria infecções de baixa intensidade e essa interpretação evitaria que indivíduos, supostamente positivos, fiquem sem tratamento (Sousa-Figueiredo *et al.*, 2015). Se a leitura é dada como positiva, uma maior sensibilidade e, conseqüentemente, menor especificidade é estimada pelo POC-CCA®. Silveira e colaboradores (2016) demonstraram que a sensibilidade diminuiu de 85,4% para 68,7% e a especificidade aumentou de 78% para 97,6% quando os traços foram considerados negativos comparado ao K-K (2 L) (Silveira *et al.*, 2016). Empregando um padrão de referência (K-K 18 L, 1 GS e Helmintex), Oliveira e colaboradores (2018) mostraram resultado similar no qual a sensibilidade diminuiu de 64,9% para 26,8% e a especificidade aumentou de 69,2% para 98,3% (Oliveira *et al.*, 2018).

Souza-Figueiredo e colaboradores (2015), previamente, reportaram que em uma área de baixa endemicidade na África (< 10% de prevalência) o POC-CCA apresentava maior acurácia em relação ao K-K quando os traços eram considerados negativos (Sousa-Figueiredo *et al.*, 2015). Comparando com K-K convencional, Bezerra e colaboradores (2017) demonstraram que a concordância do POC-CCA (traço negativo) é maior do que POC-CCA® (traço positivo) (Kappa = 0,12 vs 0,03) (Bezerra *et al.*, 2018). Silva e colaboradores (2018) apresentaram dados contrários ao anterior. Avaliando a concordância entre POC-CCA (traço negativo ou positivo) com um método parasitológico de referência, Lindholz e colaboradores (2018) demonstraram melhor índice quando os traços são considerados negativos (Kappa = 0,15 vs 0,28) enquanto que Oliveira e colaboradores (2018) mostraram o contrário, melhor concordância quando traços são interpretados como positivos (Kappa = 0,34 vs 0,25) (Lindholz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

As divergências das leituras dos traços permanecem um problema no desempenho do POC-CCA®. Coelho e colaboradores (2016) visando eliminar as dúvidas sobre a interpretação do traço propuseram um passo adicional na execução do POC-CCA® baseado na concentração de 10 vezes da urina por liofilização. A sensibilidade de POC-CCA Lyo foi 56% enquanto que o POC-CCA® convencional foi 6% comparado a um padrão de referência (24 K-K L e 2 GS). Entre as 13 leituras que mudaram de negativas para traços, 10 correspondiam a indivíduos com ausência de ovos nas fezes. Entre as 15 leituras que mudaram de traços para positivas, 13 correspondiam a indivíduos com ovos nas fezes. Considerando os traços como negativos após a liofilização baseados nesses resultados, a concordância entre o padrão de referência e POC-CCA Lyo foi 0,401 (*moderate agreement*), enquanto que se os traços fossem considerados positivos após a concentração da urina a concordância foi 0,125 (*slight agreement*) (Coelho *et al.*, 2016).

Posteriormente Grenfell e colaboradores (2018) desenvolveram uma nova versão (POC-CCA FLT) adaptando a concentração da urina para filtros de 30 kDa visando uma otimização do tempo. O POC-CCA Lyo gasta 34 h para obtenção do resultado final e a necessidade de um liofilizador não o torna prático no campo. POC-CCA FLT leva 50 min para liberação do resultado e necessita apenas de uma microcentrífuga para execução. Na localidade de Samambaia, uma área sem transmissão, porém, localizada próxima a uma região endêmica, POC-CCA FLT identificou corretamente 94 casos como negativos, considerando os traços como negativos após a concentração. Se os traços fossem considerados positivos no POC-CCA convencional, 63 indivíduos receberiam o tratamento indevidamente. Em Estreito de Miralta, uma área de baixa endemicidade com taxa de positividade de 14,86% (11/74) e localizada próximo a Samambaia, a acurácia diagnóstica aumentou de 0,51 para 0,86 quando POC-CCA® e POC-CCA FLT foram empregados, respectivamente. POC-CCA® identificou 33 indivíduos como positivos seguindo as recomendações da leitura do traço como positivo, enquanto que POC-CCA FLT identificou 17 indivíduos (Grenfell *et al.*, 2018).

A intensidade da infecção é baseada na contagem de ovos segundo a OMS. Adriko e colaboradores (2014) e demais estudos na África demonstraram a correlação entre a intensidade da coloração da banda e as cargas parasitárias em opg (Coulibaly *et al.*, 2011; Shane *et al.*, 2011; Adriko *et al.*, 2014). No Brasil, Oliveira e colaboradores (2018) e Silveira e colaboradores (2016) encontraram uma correlação positiva significativa entre os dois parâmetros, enquanto que Grenfell e colaboradores (2018) e Lindholz e colaboradores (2018) não observaram o mesmo (Silveira *et al.*, 2016; Grenfell *et al.*, 2018; Lindholz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018). A falta de um indicador da intensidade da infecção é uma desvantagem do POC-CCA® visto que essa medida é utilizada na implementação de ações no controle da morbidade (Kittur *et al.*, 2016; Colley *et al.*, 2017).

Antígenos marcadores de diagnóstico

Os antígenos empregados no imunodiagnóstico garantem a especificidade do teste e podem ser obtidos e caracterizados de diversas formas evolutivas do parasito. A busca por frações de diferentes estágios tem sido relacionada à identificação de antígenos que possam ser usados na determinação de uma fase específica da infecção. Diferentes abordagens têm

sido realizadas na busca por um marcador específico para fase aguda, fase crônica e fase após tratamento (Mutapi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015; De Assis *et al.*, 2016).

O uso de antígenos de formas jovens como cercárias e esquistossômulos foi associado com a detecção da fase inicial da doença (pré-patente e aguda) (Lunde *et al.*, 1979; Chand *et al.*, 2010; Kinkel *et al.*, 2012; Grenfell, R., Martins, W., *et al.*, 2013; Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013). Por antecederem a postura de ovos, os antígenos brutos de verme também apresentaram superioridade quando comparados aos antígenos de ovo na detecção de infecções precoces (Beck *et al.*, 2008; Grenfell, Martins, *et al.*, 2012). O tegumento é um forte ativador do sistema imune, assim como as proteínas secretadas/excretadas, fazendo com que os extratos dessas porções sejam investigados na busca por antígenos com potencial para o diagnóstico (Van Balkom *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Ludolf *et al.*, 2014; Cosenza *et al.*, 2017). O SEA contém grande quantidade de frações antigênicas, contudo muitas delas não são liberadas por ovos viáveis, sendo, portanto esse extrato menos investigado para fins de diagnóstico (Ashton *et al.*, 2001).

Uma das dificuldades na busca por um antígeno específico é a conservação de algumas proteínas por toda a vida do parasito. Curwen e colaboradores (2004) em seu estudo comparando as quatro fases de desenvolvimento (cercária, verme adulto, esquistossômulo e ovo) demonstraram um elevado grau de similaridade entre elas, identificando 70% de semelhança, principalmente nas fases adjacentes, sugerindo que essas proteínas participam das vias elementares e essenciais de desenvolvimento no parasito (Curwen *et al.*, 2004).

Os antígenos de cercárias são frequentemente menos empregados devido às controvérsias da sua baixa sensibilidade por alguns autores (Chand *et al.*, 2010; Kinkel *et al.*, 2012). Explicações suportam a idéia que a exposição ao sistema imune da derme por essas formas é de curta duração, sendo modulado rapidamente (Mountford e Trottein, 2004). O antígeno recombinante *calreticulin and cercarial transformation fluid* (CTF) foi utilizado no ELISA indireta e demonstrou a mesma sensibilidade (87,9%), porém maior especificidade (com menos reação cruzada) em relação ao SEA na identificação de indivíduos positivos e negativos de área endêmica (68,4% vs 26,4%). Na comparação em relação aos indivíduos negativos de área não endêmica (casos importados), a especificidade do CTF em relação ao SEA foi aproximada (100% vs 95,2%). Diante do bom desempenho na identificação de infecções precoces, CTF está sob validação no formato de teste rápido (RDT) (El Aswad Bel *et al.*, 2011).

Geralmente, a sensibilidade do ELISA indireto utilizando antígenos de verme adulto é alta enquanto que a especificidade é baixa durante a aplicabilidade em áreas endêmicas, assim como o uso na discriminação da infecção aguda e crônica (Sorgho *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2012; Sarhan *et al.*, 2014). A proteína recombinante SmRP26 (rSm22.3) é uma proteína do verme adulto e foi, inicialmente, indicada na detecção da fase aguda da infecção por ELISA (Makarova *et al.*, 2003; Makarova *et al.*, 2005). Entretanto, posteriores estudos demonstraram baixa sensibilidade (68%), porém alta especificidade (90%) na discriminação das fases (Tanigawa *et al.*, 2015). Uma abordagem experimental sugeriu o antígeno recombinante *tandem repeat recombinant protein 10* (rSmTR10) como um potencial marcador na avaliação da cura após tratamento com PZQ, superior a SEA e SWAP (Kalenda *et al.*, 2015). O uso de um *pool* de peptídeos no IgG-ELISA determinou uma sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,2% na detecção de indivíduos agudos e crônicos para *S. mansoni* (De Oliveira *et al.*, 2008). Os antígenos Catapsina B (31 kDa) e asparaginil endoproteínase (32 kDa), duas enzimas proteolíticas oriundas do tubo digestivo do verme, foram descritos na identificação da fase aguda e crônica da infecção (Valli *et al.*, 1999; Vendrame *et al.*, 2001). A proteína de choque térmico HSP70, demonstrou resultados promissores no diagnóstico de infecções precoces e crônicas (Kanamura *et al.*, 2002).

Embora o SEA tem sido empregado juntamente ao SWAP no diagnóstico de indivíduos de área não endêmica, que entraram em contato com áreas de transmissão pela primeira vez, assim como na detecção de indivíduos de áreas endêmicas, existem poucos estudos na busca de alvos para diagnóstico provenientes do SEA (Van Gool *et al.*, 2002; El Aswad Bel *et al.*, 2011; Kinkel *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012). Devido a forte resposta imune que esse extrato desencadeia, a detecção de anticorpos é facilmente detectada após a oviposição (Meevissen *et al.*, 2010). Esse fato pode justificar a grande variabilidade do uso do SEA na diferenciação entre a fase aguda e crônica (Rabello *et al.*, 1995; Valli *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2008). O uso do SEA na avaliação de cura após o tratamento apresenta baixa especificidade quando aplicado no IgG-ELISA, explicado pela contínua liberação de antígenos solúveis do ovo e a presença de anticorpos circulantes por longos período após o tratamento (Mott e Dixon, 1982).

Alguns componentes do SEA já foram purificados e aplicados ao diagnóstico. Dentre estes, está o *cation exchanging fraction-6* (CEF-6), o qual é um complexo antigênico abundante secretado pelo ovo, formado por duas glicoproteínas, o ômega 1 (31 kDa) e o alpha 1 (18/22 kDa) (Dunne *et al.*, 1984; Doenhoff *et al.*, 1993; Bligh *et al.*, 2010). Esse antígeno foi identificado em pacientes de área endêmica o qual demonstrou ser um bom marcador de

controle de cura, com significativa queda dos níveis de IgG no ELISA, conseguindo diferenciar infecções ativas de tratadas (Doenhoff *et al.*, 2003). O antígeno IPSE, a fração alpha 1 de CEF6, demonstrou em ensaios de ELISA ser o principal antígeno reconhecido precocemente durante a infecção comparado ao antígeno total de CEF6 e o antígeno solúvel de ovo (Schramm *et al.*, 2006). Além do CEF-6, uma proteína antioxidante secretada pelo ovo de aproximadamente 12 kDa, a thioredoxina, mostrou uma pronunciada indução da resposta humoral (Kwatia *et al.*, 2000).

3.5.3 Testes moleculares

As técnicas moleculares também ganham destaque devido à detecção e quantificação do DNA do parasito. As abordagens afirmam 100% de especificidade, e sensibilidade igual ou um pouco superior às técnicas microscópicas (80-90%) o que vem agregado valor na identificação de indivíduos com pouca eliminação de ovos (Verweij e Stensvold, 2014). Uma modificação na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi proposta para a detecção de DNA do parasito em amostras fecais, denominada PCR-ELISA, como uma alternativa ao diagnóstico de pacientes com baixa carga parasitária (Gomes *et al.*, 2010). Esse sistema envolve a amplificação de uma região específica do DNA e a detecção do produto amplificado na PCR por um ensaio imunoenzimático. Gomes e colaboradores (2010) demonstraram 30% de positividade para infecção por *S. mansoni* por PCR-ELISA e 18% por K-K (12 L) em uma população residente em área endêmica do Brasil (Kappa = 0,663) (Gomes *et al.*, 2010). Siqueira e colaboradores (2015) demonstraram 23,4% de positividade no PCR-ELISA e 14,4% empregando o K-K (12 L). PCR-ELISA detectaram 20 casos positivos não identificados no parasitológico (K-K 12 L). Entretanto quando aplicado uma extensa avaliação parasitológica como referência, a concordância com o PCR-ELISA foi mais baixa (Kappa = 0,426). Desvantagens como a inibição da DNA polimerase durante a amplificação, a ausência de ovos nas fezes (ausência do DNA do parasito) e ocorrência de contaminação podem explicar as falhas da técnica (Siqueira *et al.*, 2015).

Para a detecção de DNA em urina, técnicas adicionais de sedimentação e filtração para concentração das amostras têm aumentando consideravelmente a sensibilidade. Além das amostras de urina e fezes, as técnicas de PCR também permitem a detecção em amostras

ginecológicas (sêmen e lavados vaginais), soro, plasma e sangue (Utzinger *et al.*, 2015). Espírito-Santo *et al.* (2014) observaram baixa sensibilidade pela PCR realizada em soro humano, quando comparada à PCR realizada nas fezes, utilizando a técnica de K-K como referência. Entretanto, em casos de indivíduos retornando de viagens de áreas sob risco de transmissão, a PCR de soro e plasma foi recomendado para detecção de fase aguda da doença, uma vez que a presença de anticorpos é tardia comparada a detecção molecular (Espírito-Santo *et al.*, 2014). Hussein *et al.* (2012) identificaram DNA do parasito no soro de camundongos com apenas 3 dias de infecção, fortalecendo o uso da PCR para o diagnóstico precoce na fase pré-patente da infecção (Hussein *et al.*, 2012).

A tecnologia de LAMP (*loop mediated isothermal amplification*) é uma técnica que diferente do PCR convencional, não necessita de várias temperaturas na sua execução, sendo realizada com uma temperatura constante. Gandasegui e colaboradores (2018) demonstraram a eficiência de LAMP realizado através da amplificação do DNA em amostras de fezes, na detecção de indivíduos de uma área de baixa endemicidade do Brasil. A técnica SmMIT-LAMP identificou 49 indivíduos como positivos enquanto que o K-K identificou apenas 13 (Gandasegui *et al.*, 2018). Este resultado indica que o LAMP pode se tornar uma ferramenta sensível para o diagnóstico de infecções de baixa intensidade.

Mesmo com especificidade e sensibilidade significativas, os testes moleculares raramente fazem parte do diagnóstico clínico nos países endêmicos devido ao alto custo dos equipamentos e mão de obra especializada. Uma alternativa é aplicação na elaboração de algoritmos durante a avaliação de áreas de baixa endemicidade para certificar-se dos casos negativos (PCR para indivíduos sem ovos nas fezes com presença de anticorpos anti-*Schistosoma*).

4 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de Estudo

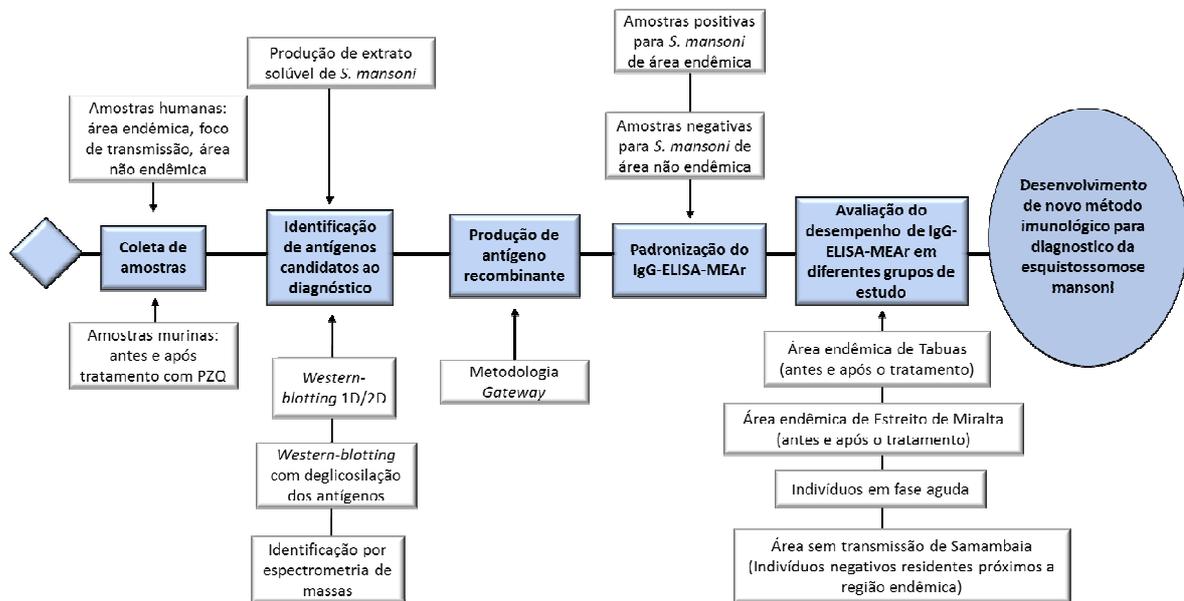


Figura 7: Fluxograma de estudo.

4.2 Aspectos éticos

Para manuseio de amostras humanas da área de rural de Montes Claros, a autorização foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (CEPSH 03/2008 e CEP 893.582 11/2014) e Comitê de Ética Nacional (784/2008, CONEP 14886), sendo os objetivos do estudo apresentados e explicados a todos os participantes e os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinados individualmente e armazenados. Para amostras humanas dos pacientes de São João Del Rei a autorização foi concedida pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Para manuseio de amostras murinas, a autorização foi concedida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA LW 31/15).

4.3 Obtenção de amostras

4.3.1 Amostras humanas

As amostras humanas foram obtidas de diferentes áreas e separadas nos seguintes grupos de estudo: indivíduos de área endêmica subdivididos em fase crônica (FC), após 180 dias do tratamento (TTO) e positivos para outros helmintos (*Trichuris trichiura*, ancilostomídeos, e *Enterobius vermicularis*) (HT); indivíduos de um novo foco de transmissão em fase aguda (FA), indivíduos negativos residentes de área não endêmica (NN), indivíduos negativos residentes de área sem transmissão localizada próxima a região endêmica (NE). A descrição das áreas e obtenção das amostras estão descritas a seguir. As amostras sorológicas estão armazenadas no biorepositório do Grupo da Biologia do *S. mansoni* e sua Interação com o Hospedeiro no Instituto Rene Rachou. Essas amostras foram empregadas individualmente ou em *pool* durante a execução dos objetivos deste trabalho.

4.3.1.1 Amostras de indivíduos de área endêmica (FC, TTO, HT)

As amostras de indivíduos dos grupos FC, TTO e HT, foram obtidas de diferentes áreas endêmicas localizadas na região rural de Montes Claros, Minas Gerais: Pedra Preta, Tabuas e Estreito de Miralta (Figura 8). Essas amostras foram validadas por uma extensa avaliação parasitológica adotada em cada área como referência para infecções de baixa intensidade (< 100 opg) (Siqueira *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016). A grande maioria dos indivíduos infectados residentes dessas áreas possuíam baixa intensidade de infecção (< 100 opg) e são assintomáticos.

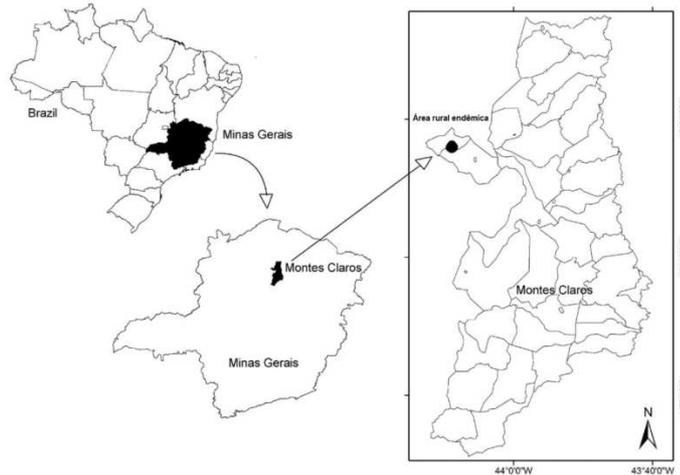


Figura 8: Localização de área rural endêmica de Montes Claros, Minas Gerais. Fonte (Enk *et al.*, 2012) adaptado.

Área endêmica: Pedra Preta

A comunidade de Pedra Preta é uma área endêmica para esquistossomose localizada na zona rural do município de Montes Claros, Norte do estado de Minas Gerais, situada a aproximadamente 500 km de Belo Horizonte (Figura 8). A principal atividade exercida pela população destas áreas está ligada à agricultura e pecuária. A área foi escolhida pelo perfil da população, pela presença de esquistossomose e pelo baixo índice de migração (população residente fixa). Dados prévios fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros registraram prevalência de 16,57% em 2004.

O estudo foi realizado no período de 2009 a 2010 abrangendo 201 indivíduos (93 mulheres/108 homens), apresentando entre 1 e 94 anos de idade. O trabalho constituiu de coleta de amostras de fezes e sangue. A prevalência foi 35,8% (72/201), determinada pelas técnicas parasitológicas de K-K (2L/A1 - 2L/A2 - 2L/A3 - 12L/A4 = 18L/4A) e TF-Test (3 procedimentos de 500 mg = 1500 mg/3 amostras) (Siqueira *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2015). Pela técnica de K-K a média geométrica foi de 4,8 opg e a mediana 4 opg. Os pacientes positivos foram tratados com PZQ (50 mg/kg para adultos e 60 mg/kg para crianças, dose única, via oral) e submetidos a uma nova coleta após 30, 90 e 180 dias do tratamento. As infecções por outros helmintos foram tratadas com Albendazol 400 mg em dose única via oral. As amostras de sangue foram incubadas por 3 h e centrifugadas a 10.000 xg por 5 min para coleta do soro.

Área endêmica: Tabuas

A comunidade rural de Tabuas foi escolhida por ser uma área endêmica para esquistossomose também localizada na zona rural do município de Montes Claros. Segundo o Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros foi registrada uma prevalência de 29,11% em 2010 (2L/1A) seguido do tratamento dos casos com PZQ. Nessa localidade se encontra a cachoeira de Tabuas, uma beleza natural que é um atrativo para os moradores e turistas que vão visitar a região (Figura 9). Foram coletados exemplares de caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário) na cachoeira, os quais estavam eliminando cercárias de *S. mansoni*.

O estudo foi realizado no período de 2012 a 2013 abrangendo 148 indivíduos (73 mulheres/75 homens), apresentando idade entre 01 e 86 anos. O trabalho constituiu de coleta de amostras de fezes, sangue e urina. A prevalência foi de 31,0% (46/148) determinada pelas técnicas parasitológicas de K-K (24L/1A = 1000 mg) e GS (2 procedimentos de 500 mg = 1000 mg) utilizando uma amostra. A carga parasitária da população foi determinada pela média geométrica e pela mediana do número de opg. Pela técnica de K-K a média geométrica foi de 28,4 opg e a mediana 23 opg. Pela técnica do GS a média geométrica foi de 5,6 opg e a mediana 4 opg. O tratamento dos indivíduos infectados por *S. mansoni* e outros helmintos foi realizado como descrito anteriormente assim como a obtenção das amostras de soro.

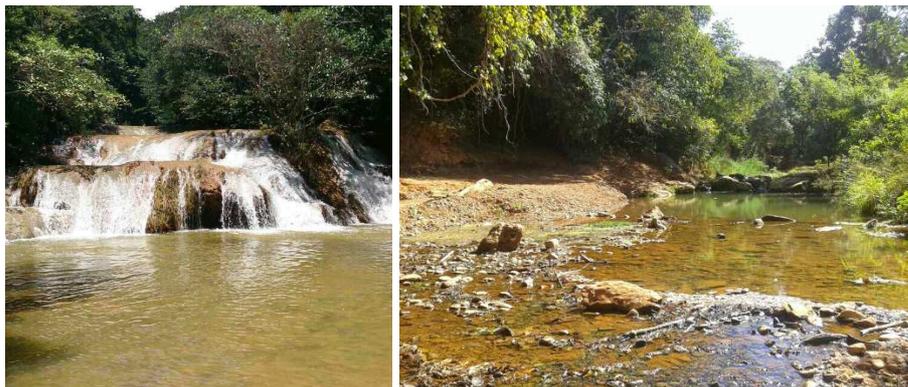


Figura 9: Cachoeira da localidade de Tabuas, na zona rural de Montes Claros, Minas Gerais. Fonte: Arquivos da autora.

Área endêmica: Estreito de Miralta

A seleção da comunidade rural de Estreito de Miralta seguiu os mesmos critérios anteriores. O encontro do rio de Estreito com o de Tabuas foi outro critério na seleção da área (Figura 7). Essa localidade não possuía dados de prevalência prévios. O estudo foi realizado no período de 2013 a 2014 abrangendo 142 indivíduos (77 mulheres/65 homens) com idades entre 01 e 86 anos (Figura 10). O trabalho constituiu de coleta de amostras de fezes, sangue, urina e saliva. A prevalência foi 24,6% (35/142) determinada pelas técnicas parasitológicas de K-K (24L/1A = 1000 mg) e GS (2 procedimentos de 500 mg = 1000 mg) utilizando uma amostra (Siqueira *et al.*, 2016). Pela técnica de K-K a média geométrica foi de 6,2 opg e a mediana 6 opg. Pela técnica do GS a média geométrica foi de 4,6 opg e a mediana 4,5 opg. O tratamento dos indivíduos infectados por *S. mansoni* e outros helmintos foi realizado como descrito anteriormente assim como a obtenção das amostras de soro.



Figura 10: Rio e residentes da localidade de Estreito de Miralta, Montes Claros, Minas Gerais. Fonte: Arquivos da autora.

4.3.1.2 Amostras de indivíduos de um novo foco de transmissão (FA)

As amostras de FA foram provenientes de indivíduos infectados simultaneamente em um distrito rural de São Joao Del Rei, Colônia do Jose Teodoro, localizado a 13 km da cidade, uma área até então considerada não endêmica para esquistossomose. No período de dezembro de 2009 a março de 2010, um grupo de 50 turistas ficou hospedado em um sítio e tiveram contato com um córrego. Dois meses depois um paciente foi diagnosticado com

mielorradiculopatia esquistossomótica e outras pessoas desse mesmo grupo reportaram sintomas consistentes da esquistossomose aguda. Foi dado início as investigações e o Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica/Fiocruz comprovou a existência de caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário) eliminando cercária na área. Exceto Matosinhos, nenhuma outra região próxima a São Joao Del Rei apresentava relatos da transmissão da esquistossomose desde 1971. O estabelecimento desse novo foco de transmissão foi derivado da migração de trabalhadores infectados vindos de uma área endêmica do nordeste de Minas Gerais.

Os 50 indivíduos foram entrevistados para identificação de sinais e sintomas, submetidos ao diagnóstico por imagem e a coleta de fezes e soro (aproximadamente 2 meses após o contato). Duas amostras de fezes de 24 doadores foram coletadas e submetidas à análise através do método de K-K ($2L/A1-2L/A2 = 4L/2A$) (Lambertucci *et al.*, 2013), os quais foram todos positivos. Amostras de soro foram obtidas para análise através do ELISA-SWAP (Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013). A infecção por *S. mansoni* foi definida para indivíduos que apresentaram um dos seguintes critérios: presença de ovos em amostras fecais, título de IgG detectado por ELISA-SWAP, mieloradiculopatia detectada por ultrassonografia, e/ou sintomas relacionados com a esquistossomose aguda. Cinco pacientes foram hospitalizados com formas graves da infecção, entre elas infecção pulmonar grave, mieloradiculopatia esquistossomótica e desidratação grave. Todos os pacientes foram tratados com PZQ 50 mg/kg.

4.3.1.3 Amostras de indivíduos residentes de área não endêmica (NN)

As amostras negativas (NN) foram provenientes de indivíduos saudáveis residentes de áreas não endêmicas para esquistossomose localizadas em Belo Horizonte, Minas Gerais. O grupo foi constituído de 65 indivíduos saudáveis (40 mulheres/25 homens) com idades entre 21 e 70 anos os quais doaram amostras de sangue e fezes para análise. As amostras foram validadas pelas técnicas parasitológicas de K-K ($24L/1A = 1000$ mg) e GS (2 procedimentos de 500 mg = 1000 mg). Nenhum dos voluntários declarou ter morado ou visitado alguma área endêmica nos últimos 5 anos assim como qualquer histórico médico relacionado à esquistossomose.

4.3.1.4 Amostras de indivíduos residentes de área sem transmissão localizada próxima a região endêmica (NE)

As amostras do grupo NE foram da área de Samambaia. A seleção dessa comunidade seguiu os mesmos critérios descritos para áreas endêmicas. O rio de Samambaia não tinha nenhuma relação com o de Tabuas (Figura 11). Segundo o Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros, uma prevalência de 1,02% foi registrada em 2005 (1/98). O estudo foi realizado no ano de 2014 envolvendo 177 residentes (78 mulheres/99 homens) apresentando idade entre 02 e 84 anos. O trabalho constituiu de coleta de amostras de fezes, sangue, urina e saliva. A prevalência foi determinada pelas técnicas parasitológicas de K-K (24 lâminas = 1000 mg) e GS (2 procedimentos de 500 mg = 1000 mg). Embora Samambaia se localize próxima às demais áreas endêmicas e possua as mesmas características socioeconômicas e geográficas, a mesma apresentou apenas 1 indivíduo positivo para esquistossomose (8 opg) e nenhuma outra infecção por outros helmintos (Grenfell *et al.*, 2018). Entretanto, o único indivíduo positivo que determinou a prevalência de 0,56% (1/177), havia recentemente mudado para a região, não podendo ser considerado caso autóctone.



Figura 11: Área de Samambaia localizada na zona rural do município de Montes Claros, Minas Gerais.
Fonte: Arquivos da autora.

4.3.2 Amostras murinas

Para a obtenção de amostras sorológicas murinas, camundongos *swiss* machos (4 a 6 semanas) foram inoculados com 25 cercárias (desvio padrão de ± 10) de *S. mansoni* (cepa LE) por via subcutânea. Amostras de sangue foram coletadas pela artéria supra mandibular do dia 0 ao dia 140 após a infecção com intervalos de 7 a 15 dias entre elas. Uma parte dos animais foi tratada 120 dias após a infecção em dose única oral de PZQ (400 mg/kg) por gavagem e

uma nova coleta de sangue realizada nos dias 30, 60, 90, 120, 150 e 180 após o tratamento (Figura 12). As amostras de sangue foram incubadas por 3 h à temperatura ambiente, centrifugadas a 10.000 xg por 5 min e o soro armazenado a -20°C. No dia 120 após a infecção e 180 após o tratamento, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical para perfusão do sistema porta com solução salina 0,85% e 50 U/L heparina para obtenção dos vermes adultos (Pellegrino e Siqueira, 1956). A quantificação dos vermes presentes no fígado e mesentério e oograma foram realizadas.

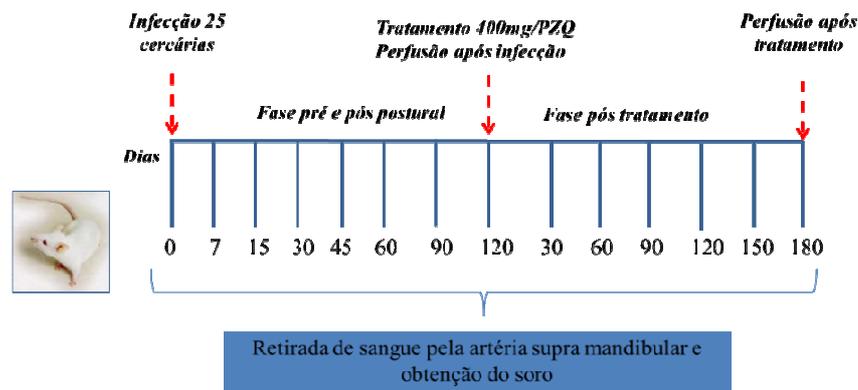


Figura 12: Delineamento experimental murino.

4.4 Preparação do extrato solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA)

4.4.1 Preparação do SEA

A produção do antígeno SEA seguiu o protocolo de Ashton e colaboradores (2001) com modificações (Ashton *et al.*, 2001). Camundongos *swiss* machos (4 a 6 semanas) foram inoculados com 100 cercárias (desvio padrão de ± 10) de *S. mansoni* (cepa LE) por via subcutânea. Após 45 dias da infecção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fígados imediatamente acondicionados em PBS. Aproximadamente 20 fígados foram homogeneizados em liquidificador (função pulsar) com *Snail buffer* (1,79 g Na₂HPO₄, 0,09 g KH₂PO₄ em 200 mL H₂O). Foi adicionado 0,02% de tripsina (*Trypsin from porcine pancreas tipo IX-S*, Sigma-Aldrich) e a mistura foi incubada por 3 h a 37°C sob agitação. O homogenato foi passado em tamises de 300 e 180 µm respectivamente e os ovos recuperados por decantação. Os ovos foram lavados com PBS por 3 vezes sendo a última lavagem com PBS acrescido de coquetel de inibidor de protease (PIC - *Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-

Aldrich). Os ovos foram sonicados a 40% de potência (Sonifer 250 Branson) em 600 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol 1%, PIC) por 6 vezes com pulsos de 10 s e 1 min de descanso em banho de gelo, e centrifugados a 50.000 xg por 1 h a 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota submetida à dosagem proteica pelo método do ácido bicinonínico (BCA). As proteínas foram precipitadas através de ácido tricloroacético (TCA) e acetona. A qualidade do extrato final foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 12%).

4.4.2 Precipitação de proteínas por TCA-acetona

O SEA foi submetido à precipitação de proteínas através do método TCA-acetona. Para cada 1 mL de extrato foram adicionados 8 mL de acetona gelada e 1 mL de solução de TCA. A mistura foi homogeneizada e deixada 16 h a -20°C para precipitação das proteínas. A mistura foi centrifugada a 20.000 xg, 30 min a 4°C, o precipitado ressuspendido e lavado por 2 vezes com 500 μ L de acetona gelada e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi deixado à temperatura ambiente para evaporação total da acetona e finalmente ressuspendido em tampão de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS (3-((3-Cholamidopropil) dimetilamônio)-1-propanosulfonato) 2%, azul de bromofenol 0,002%).

4.5 Eletroforese e *Western blotting*

4.5.1 *Western blotting* unidimensional (WB)

O SEA foi submetido à SDS-PAGE 12% em sistema *Mini-Protean III* (BioRad) empregando-se a técnica descrita por Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). As concentrações dos géis utilizados foram 5% para o gel de concentração e 12% para o gel de separação. As amostras foram diluídas (1:2) em tampão de amostra 2x (Tris HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 0,1%, Azul de bromofenol 0,2%), fervidas por 5 min a 98°C e conduzidas a uma corrente 80-120 V em tampão de corrida (Tris 250 mM, Glicina 2,5 M pH 8,3, SDS 1%). Um dos géis foi corado com Azul de Coomassie Colloidal G-250 para análise

do perfil do extrato e o outro transferido para membrana de PVDF 0,2 μm (GE Healthcare) conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979) (Towbin *et al.*, 1979). A transferência foi realizada sob uma corrente de 100 V durante 120 min a 4°C, em sistema *Mini-Trans-Blot* (Bio-Rad) usando tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). A membrana foi corada com Ponceau por 10 min, cortada em tiras e lavada com água tipo I. As tiras foram bloqueadas com 5% de proteínas do leite diluídas em tampão tris-salina (TBS) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) com 1% de Tween 20 (TBS-T) sob agitação por 16 h a 4°C, e lavadas 5 vezes com TBS-T por 5 min a temperatura ambiente. Os soros (murino/humano) foram adicionados como anticorpo primário diluídos em TBS-T com 3% de proteínas do leite e incubado a temperatura ambiente sob agitação por 2 h. As tiras foram lavadas novamente e o anticorpo secundário anti-IgG (humano/camundongo) conjugado à enzima peroxidase adicionado em TBS-T com 3% de proteínas do leite e incubado sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Após última etapa de lavagem, as tiras foram submetidas a uma lavagem de 10 min em TBS e reveladas pelo método de quimiluminescência com o kit ECL Plus (GE Healthcare), e a imagem foi capturada por sistema de imagem digital LAS4000 (GE Healthcare).

4.5.2 Western blotting bidimensional (WB-2D)

Na primeira dimensão da eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), as proteínas do SEA foram separadas por isoeletrofocalização (IEF). Para a realização dos experimentos de WB-2D, dois 2D-PAGEs foram realizados simultaneamente, um para ser transferido e outro para ser corado por Azul de Coomassie Colloidal G-250 para excisão dos *spots* e identificação das proteínas. Sendo assim, 45 e 60 μg de extrato (transferência e coloração respectivamente) foram solubilizadas em tampão de reidratação contendo 1% DTT e 0,8% anfólitos pH 3-10 para um volume final de 125 μL . As amostras foram acondicionadas em sarcófagos de 7 cm (*Strip Holder*, GE Healthcare) e as fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG) 3-10 linear (*Immobiline DryStrip Gels*, GE Healthcare) foram adicionadas para a incorporação das proteínas no gel de primeira dimensão. A IEF ocorreu a 20°C sob corrente de 50 μA /fita de acordo com o seguinte protocolo: reidratação por 12 h; 500 V durante 30 min; 1000 V por 30 min e 8000 V por 3 h (equipamento *Ettan IPGphor III*, GE Healthcare). Após o término da focalização isoeletrica, as fitas foram submetidas à etapa de equilíbrio (redução e alquilação das proteínas). A redução foi realizada com 1% de DTT em

solução de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl 75 mM pH 8,8, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) durante 15 min a temperatura ambiente. Em seguida a alquilação foi realizada com iodoacetamida (IAA) a 4% nas mesmas condições.

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas por massa molecular em SDS-PAGE 12%. O padrão de peso molecular foi aplicado em um pedaço de papel de filtro e posicionado sobre o canto esquerdo do gel de separação. Em seguida, a fita contendo o gel de primeira dimensão foi também posicionada sobre o gel de separação e ambos selados com solução de agarose 1%. A eletroforese foi realizada em sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad) a 50 V por aproximadamente 10 min e 100 V até o corante azul de bromofenol atingir a porção inferior do gel.

Após a separação das proteínas do extrato por 2D-PAGE, as mesmas foram submetidas ao *Western blotting* conforme descrito no item 4.5.1 com algumas modificações. Cada membrana foi incubada separadamente por 2 h com *pool* dos grupos FC, HT, NN, NE diluídos 1:500 e FA 1:1200 em TBS-T com 3% de proteínas do leite. Os *spots* imunogênicos identificados nos experimentos de WB-2D foram localizados sobrepondo a imagem revelada ao respectivo 2D-PAGE corado por Azul de Coomassie Colloidal utilizando o software *Photoshop* (*Adobe Systems Incorporated*) e, posteriormente, removidos para identificação por espectrometria de massas.

4.5.3 *Western blotting* com deglicosilação dos antígenos

A deglicosilação de proteínas imobilizadas em membranas de PVDF foi conduzida através do tratamento com metaperiodato de sódio seguido de borohidreto de sódio para oxidação dos carboidratos segundo a metodologia de Woodward et al. (1985) (Woodward *et al.*, 1985). Após a etapa de bloqueio dos experimentos de 1D e 2D-WB, as membranas foram incubadas com 2 ou 10 mM de metaperiodato de sódio em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 por 1 h ao abrigo de luz. As membranas foram lavadas com tampão acetato e em seguida incubadas em 50 mM borohidreto de sódio em PBS por 30 min. A membrana foi lavada com TBS-T e o procedimento de WB foi realizado como descritos anteriormente.

4.5.4 Coloração de géis de poliacrilamida por Azul de Coomassie Colloidal

Os géis de poliacrilamida foram corados por Azul de Coomassie Colloidal G-250 (Neuhoff *et al.*, 1988) o qual é compatível com a identificação de proteínas por espectrometria de massas. Os géis foram fixados em três soluções: (1) 2% ácido ortofosfórico e 30% etanol, (2) 2% ácido ortofosfórico e (3) 2% ácido ortofosfórico, 18% etanol e 15% sulfato de amônio. Foram adicionados 0,02% Azul de Coomassie Colloidal G-250 a última solução de fixação e incubado 16 h. Posteriormente, o gel foi descorado em solução de etanol 20% e conservado em sulfato de amônio 25% a 4°C.

4.6 Digestão *in gel* e preparo de amostras para espectrometria de massas

4.6.1 Digestão trípica

Após a obtenção dos 2D-PAGEs, os *spots* de interesse (proteínas diferencialmente imunorreativas nos grupos FA e FC) foram removidos e transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 300 µL de solução descorante (etanol 40%, ácido acético 7%). Esses tubos foram incubados a 37°C até a completa descoloração. A solução descorante foi retirada e os *spots* lavados 2 vezes com 500 µL de água milli-Q. A redução foi realizada pela adição de 500 µL de DTT 50 mM, 30 min a 65°C. Em seguida, o DTT foi descartado e a alquilação realizada com 300 µL de IAA 100 mM, 60 min, a temperatura ambiente ao abrigo de luz. Os *spots* foram novamente lavados e desidratados em 500 µL de 20 mM NH₄HCO₃ / Acetonitrila (ACN) 50% durante 20 min por 3 vezes. A desidratação completa dos *spots* foi realizada em *Speed Vac Concentrator Plus* (Eppendorf) durante 30 min. Os *spots* foram reidratados com 15 µL de solução 20 mM NH₄HCO₃ e 0,1 µg/µL de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega*). Após 20 min, o excesso de solução de tripsina foi retirado e os *spots* recobertos com 40 µL de solução 20 mM NH₄HCO₃ sob incubação a 37°C por 48 h para a tripsinólise. O sobrenadante de reação contendo os peptídeos trípticos foi transferido para um novo tubo. Para a extração dos peptídeos presentes no interior dos *spots* adicionou-se ao tubo 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% / ACN 50% e o sobrenadante foi recuperado após 30 min e agregado ao anterior. O Material foi desidratado em *Speed Vac*, o precipitado ressuspenso em TFA 0,1% e armazenados a 4°C. Os peptídeos trípticos obtidos foram

purificados em micro colunas de fase reversa Zip-Tip C18 (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os peptídeos foram desidratados novamente em *Speed vac* e, finalmente, solubilizados em 20 μ L de solução TFA 0,1%.

4.6.2 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

A identificação das proteínas foi realizada em plataforma LC-MS/MS composta pelo cromatógrafo UHPLC Últimate 3000 (Dionex) acoplado ao espectrômetro de massas híbrido Q-Exactive (Thermo Scientific). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Enzimologia e Proteômica (Núcleo de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Ouro Preto) em colaboração com o Prof. Dr. William de Castro Borges.

Para análise, um volume de 4 μ L do produto final da etapa de digestão triptica foi injetado no sistema LC-MS. Inicialmente, os peptídeos foram submetidos ao *trapping* em coluna C18 Acclaim[®] PepMap100 (100 μ m x 2cm, 5 μ m, 100Å; Thermo Scientific) sob fluxo de 3 μ L/min da fase móvel 98% H₂O/2% MeCN/0,1% TFA, por 3 min. Na sequência, o fluxo foi alternado para a coluna analítica Acclaim[®] PepMap RSLC (75 μ m x 15 cm, 2 μ m, 100 Å) responsável pela resolução cromatográfica dos peptídeos. A eluição se deu por gradiente de fases A (100% H₂O/0,1% ácido fórmico) e B (20% H₂O/80% MeCN/0,1% ácido fórmico), como descrito a seguir: i) 4% fase B até 55% fase B, 28 min; ii) 55% até 90% fase B em 2 min, e manutenção à 90% fase B por 5 min; iii) retorno à condição inicial, 4% fase B, para regeneração da coluna por 6 min. Os peptídeos eluídos ao longo do gradiente foram prontamente ionizados em fonte *Nanospray Flex Ion Source* (Thermo Scientific) pela aplicação de uma voltagem de 2,5 kV sob os *emitters* de nano-boro inoxidável (Thermo Scientific).

A aquisição dos dados pelo espectrômetro de massas foi realizada em modo positivo sob um programa de *Data-Dependent acquisition* (DDA). Primeiramente, *survey scans* de 300-2000 *m/z* permitiram a geração do espectro de massas dos íons precursores a 70.000 de resolução, com tempo de acúmulo de íons de até 100 ms e *AGC target* de 3e6. A partir de cada *survey scans* até os 12 precursores mais intensos (Top12) foram selecionados para fragmentação. A fragmentação se deu inicialmente pelo isolamento do íon precursor numa janela de 2 *m/z*, e posteriormente colisão com gás nitrogênio na célula de colisão, sob *normalised collision energy* de 30eV. Os espectros MS/MS foram adquiridos a 17.500 de resolução. Apenas precursores com cargas +2, +3, +4 e +5, e *AGC target* de 5e5 em, no

máximo, 150 ms foram selecionados para fragmentação. A fragmentação repetitiva dos mesmos íons pode ser reduzida pela ativação da exclusão dinâmica por 40 s.

4.6.3 Identificação das proteínas

Os espectros MS/MS adquiridos foram submetidos à busca de identidade no *software Proteome Discoverer 1.4* (Thermo Scientific), com o auxílio do algoritmo *Sequest HT*. Os espectros experimentais foram comparados a um banco de dados construído *in-house* contendo 10.779 sequências e 5.136.273 resíduos. Os parâmetros de busca utilizados foram: i) tolerância de erro do íon precursor, 10 ppm; ii) tolerância de erro na massa dos fragmentos 0.1 Da; iii) até dois sítios de clivagem perdidos foram permitidos; iv) modificações fixas: carbamidometilação de cisteína. v) modificações variáveis: oxidação de metionina e acetilação N-terminal. O resultado da busca de identidades foi posteriormente filtrado a fim de se obter uma taxa de falso positivo (FDR) de 1%. Em paralelo às identificações, foi realizada a quantificação *label-free* das proteínas identificadas. A intensidade individual das proteínas é a média das áreas sob a curva dos ≥ 3 peptídeos únicos mais intensos detectados pelo espectrômetro de massas. O conhecimento da intensidade dos íons pode ser útil na definição do componente proteico principal quando ocorrem múltiplas identificações para o mesmo *spot*.

4.7 Produção da proteína recombinante

A proteína *Major Egg Antigen* (MEA) (GenBank: XM_018794689, kappa – *National Library of Medicine, PubMed, Protein*) foi selecionada para a produção recombinante por ser unicamente detectada em indivíduos infectados com *S. mansoni* nos experimentos de 2D-WB deste trabalho, demonstrando ser uma boa candidata ao diagnóstico da doença. O gene foi clonado utilizando a plataforma Gateway® (Invitrogen, 2003) e a proteína expressa em sistema heterólogo de bactérias.

4.7.1 Tecnologia Gateway®

A tecnologia Gateway® é um método de clonagem universal baseado nas propriedades de recombinação sítio-específicas entre o bacteriófago lambda e o cromossomo da *Escherichia coli* (Landy, 1989). A reação de recombinação ocorre entre sítios específicos de interação (*att*) presentes nas moléculas de DNA dos dois organismos de modo conservativo, sem perda ou ganho de nucleotídeos. No ciclo lisogênico, a recombinação do lambda com o cromossomo da *E. coli* ocorre entre as regiões *attB* e *attP*, resultando na formação de novos sítios de interação, chamados *attL* e *attR*. No ciclo lítico, a recombinação do lambda com o cromossomo da *E. coli* ocorre entre as regiões *attL* e *attR*, resultando no restabelecimento dos sítios de interação *attB* e *attP*. Essas reações são específicas e direcionais, de modo que *attB1* recombina exclusivamente com *attP1*, *attB2* com *attP2*, *attL1* com *attR1*, e *attL2* com *attR2* (Hartley *et al.*, 2000). Esta reação é catalisada pelas enzimas produzidas pelo bacteriófago lambda e pela *E. coli* as quais se ligam as sequências específicas *att*, aproximando-as, clivando-as e unindo-as de forma covalente.

Na tecnologia Gateway®, os componentes da recombinação lambda e *E. coli* são modificados para aperfeiçoar a especificidade e eficiência do sistema. Para que um produto amplificado a partir de um determinado gene de interesse ingresse nesta plataforma é necessário um vetor doador (pDONR) que possibilite a clonagem direcional da sequência e a formação de um clone de entrada. Sendo assim, há primeiro a recombinação dos sítios *attB* presentes no produto de PCR com os sítios *attP* presentes no vetor doador, formando então um clone de entrada com os sítios *attR*. Essa recombinação, chamada de reação BP, é catalisada por uma mistura de enzimas recombinantes denominada BP clonase e simula, *in vitro*, as interações ocorridas no ciclo lisogênico do bacteriófago lambda (Figura 13). Com o clone de entrada é possível inseri-lo em diversas plataformas por meio de nova recombinação sítio-específico, chamada reação LR. Dessa forma, os sítios *attL* do vetor de entrada se recombinam com os sítios *attR* do vetor de destino (pDEST) sob a atividade da LR clonase gerando o clone de expressão contendo os sítios *attB* (Figura 14), simulando assim as interações ocorridas no ciclo lítico *in vitro*.

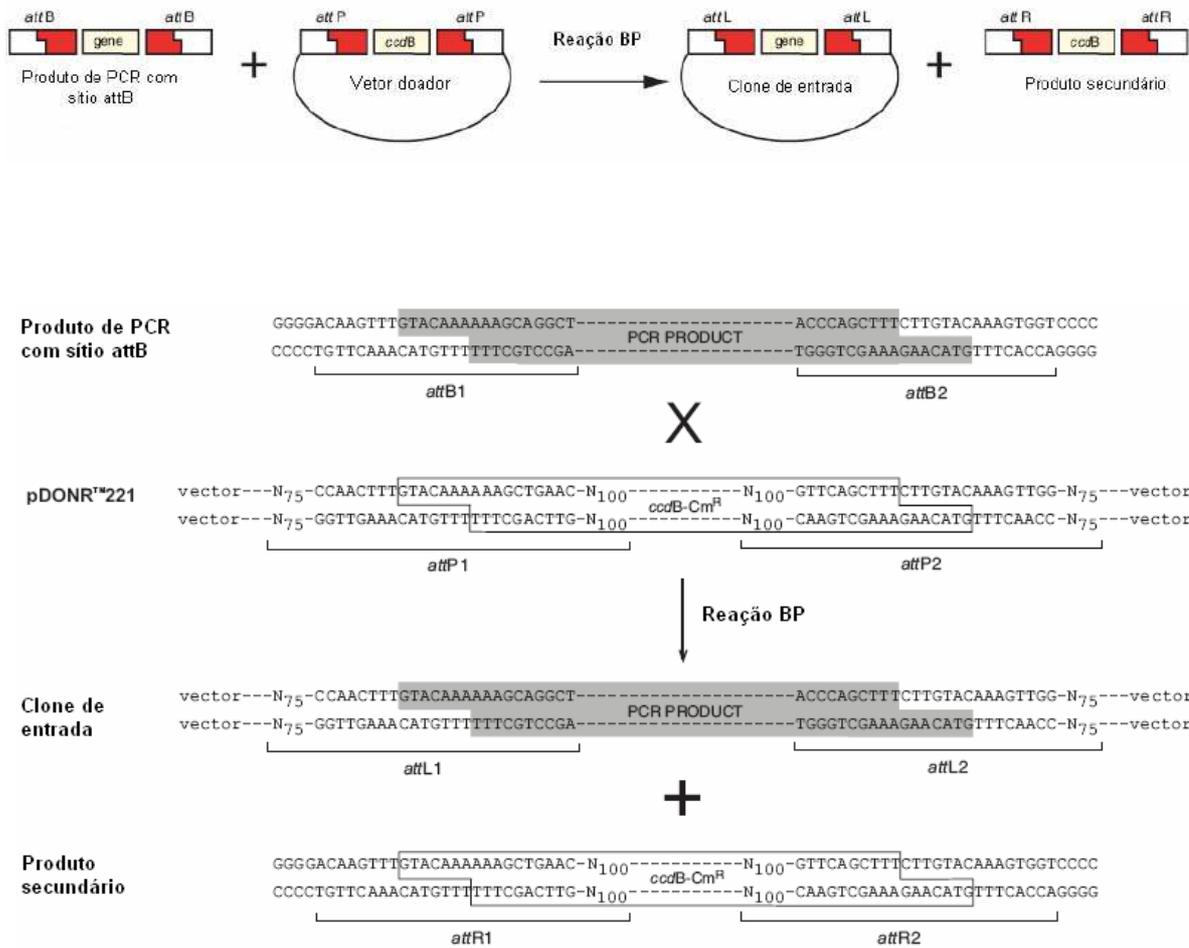


Figura 13: Ilustração esquemática da reação de recombinação BP para formação do clone de entrada com a sequência de interesse. As regiões sombreadas correspondem às sequências transferidas do produto de PCR-*attB* ao vetor doador pDONR221 formando o clone de entrada. As regiões delimitadas em caixas correspondem às sequências transferidas do vetor doador pDONR221 ao produto secundário. Fonte (Invitrogen, 2003)

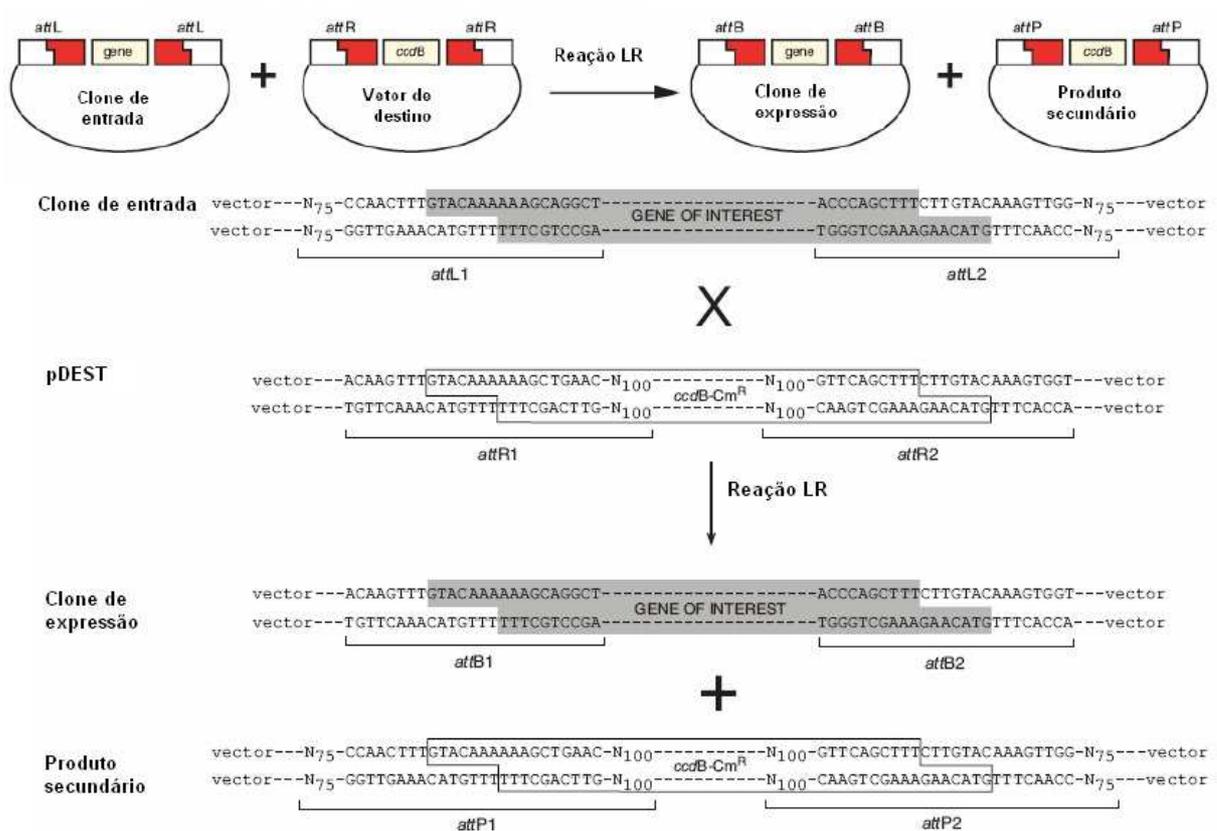


Figura 14: Ilustração esquemática da reação de recombinação LR para formação do clone de expressão com a sequência de interesse. As regiões sombreadas correspondem às sequências transferidas do clone de entrada ao vetor de destino pDEST17 formando o clone de expressão. As regiões delimitadas em caixas correspondem às sequências transferidas do vetor de destino pDEST17 ao produto secundário. Fonte (Invitrogen, 2003)

Os vetores pDONR e pDEST possuem dois sítios de recombinação *att* específicos flanqueando um cassete gênico contendo um gene de resistência a cloranfenicol (Cm^R) e um gene para seleção negativa (*ccdB*) do clone transformado. Após a reação de recombinação BP ou LR, seus cassetes são substituídos pelo gene de interesse, gerando os clones de entrada e de expressão, respectivamente. O gene *ccdB* codifica uma proteína (CdB) que interfere na enzima DNA girase da *E. coli* inibindo seu crescimento (Bernard & Couturier, 1992), sendo sua presença seleção negativa dos vetores após a recombinação e transformação. A reação de recombinação ocasiona a perda do gene Cm^R fazendo com que os clones se tornem sensíveis ao cloranfenicol. Entretanto, cada vetor seguirá carregando um gene de resistência a antibiótico (canamicina em pDONR e ampicilina em pDEST), permitindo a seleção positiva dos clones. A figura 15 representa a estratégia de trabalho utilizada para a produção de MEA recombinante (MEAr).

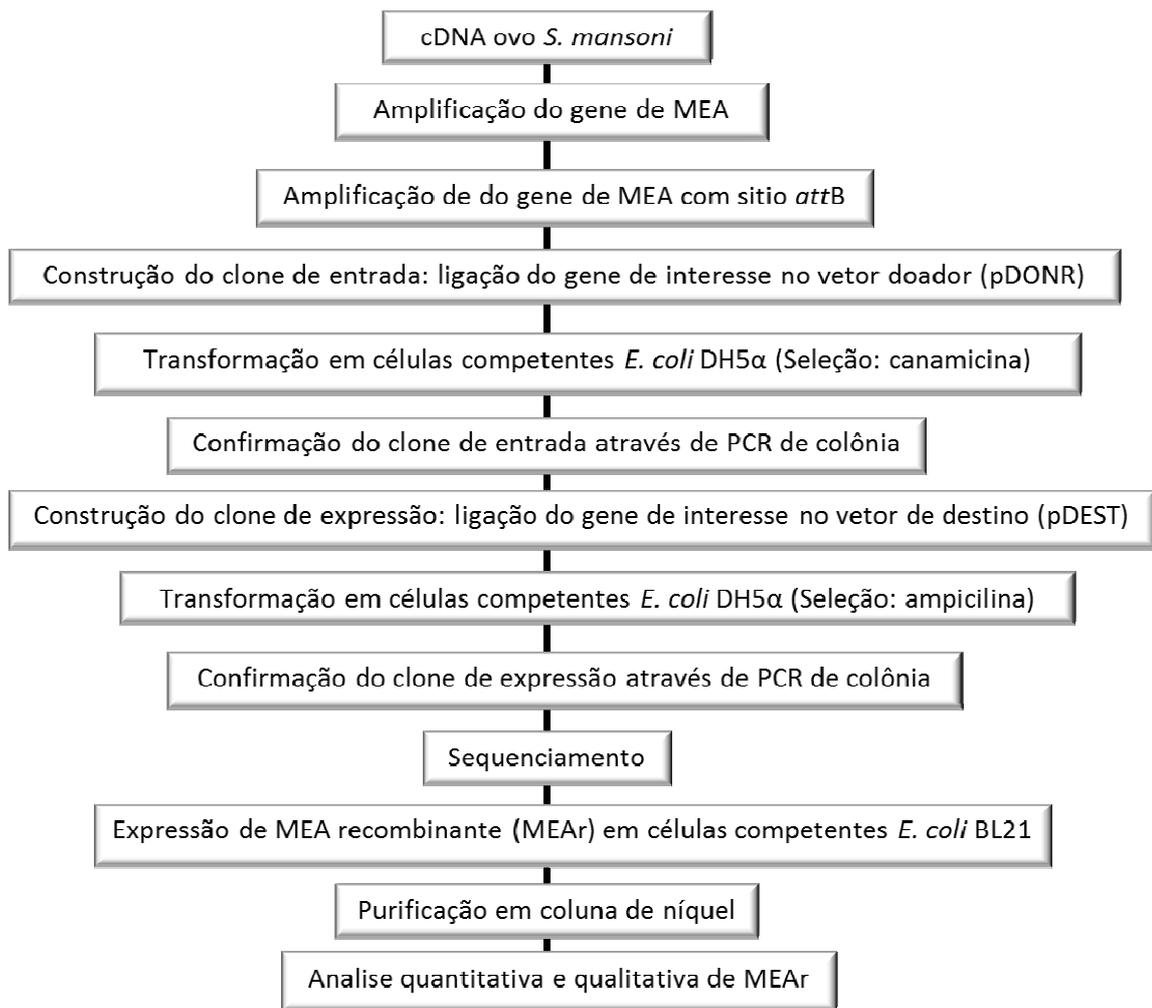


Figura 15: Estratégia de trabalho para a produção da proteína MEAr.

4.7.2 Amplificação e purificação do gene de interesse: MEA

O gene de MEA foi amplificado a partir do DNA complementar (cDNA) de ovo de *S. mansoni*. Para essa etapa, o cDNA foi adquirido através de *BEI Resources (Catalog no. NR-49421, U.S. Government property)* e utilizado como molde da PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores da reação (*primers*) *forward* e *reverse* foram elaborados baseados na sequência codificante da proteína e denominados F-MEA e R-MEA, respectivamente. O *software IDT Integrated DNA Technologies* foi utilizado para síntese dos *primers* e para análise das propriedades termodinâmicas e dimerização.

A reação de PCR foi realizada a partir de 20 μL de tampão, 5 μL de desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP) 10mM, 1,5 μL de cada *primer* (F-MEA e R-MEA) 100 μM , 0,5 μg de cDNA de ovo, 1 μL de DNA polimerase (*Q5® High-Fidelity DNA*

Polymerase, NEB) e volume de água suficiente para 100 μ L de reação. A condição de amplificação foi uma etapa inicial de 95°C por 1 min, seguido por 40 ciclos com etapa de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 57°C por 40 s, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min. Uma alíquota do produto da reação foi submetida a gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e tamanho do gene de interesse. O restante do produto foi submetido a novo gel para purificação da banda correspondente a sequência de DNA de MEA (1Kb) através do kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen) seguindo as informações do fabricante. O produto foi quantificado em espectrofotômetro (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific) e utilizado como molde para a amplificação com os sítios específicos para a plataforma Gateway®.

Novos *primers* foram sintetizados seguindo as orientações do manual Gateway® (Invitrogen, 2003) para amplificação de MEA com sítios específicos *att*. Resumidamente, foram adicionadas duas sequências distintas aos iniciadores contendo os sítios de recombinação *attB1* (*forward*) e *attB2* (*reverse*). Ao *primer forward* (F-MEA-GW) foram adicionadas 4 guaninas, a sequência do sítio de recombinação *attB1* seguidas de mais 2 nucleotídeos, a sequência consenso *Shine-Dalgarno* (responsável pela expressão da proteína nativa em *E. coli*) seguidas de 2 nucleotídeos e, finalmente, a sequência específica do gene de interesse (18 a 25 nucleotídeos). O *primer reverse* (R-MEA-GW) foi desenhado a partir de 4 guaninas, a sequência do sítio de recombinação *attB2* seguido de 1 nucleotídeo, e o códon de parada seguido da sequência específica do gene de interesse. Os *primers* foram desenhados para produção da proteína com uma cauda de histidina na porção N-terminal. Na tabela 2 segue a sequência de todos os *primers* sintetizados para a amplificação de MEA.

A PCR foi realizada a partir de 20 μ L de tampão, 2 μ L de dNTP 10mM, 5 μ L de cada *primer* (*forward e reverse*) para Gateway® 10 μ M, 0,5 μ g de DNA de MEA purificado, 1 μ L de DNA polimerase (*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, NEB) e volume de água suficiente para 100 μ L de reação. A condição de amplificação foi uma etapa inicial de 98°C por 1 min, seguido por 35 ciclos com etapa de desnaturação a 98°C por 10 s, anelamento a 70°C por 30 s, extensão a 58°C por 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. Uma alíquota do produto da reação foi submetida ao gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e tamanho do fragmento referente à MEA (1Kb). O volume restante foi submetido à purificação por etanol 100% e dosagem em espectrofotômetro para ser utilizado nas etapas posteriores de clonagem.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação de MEA

Amplificação	Nomenclatura	Direção	Sequência do primer
MEA	F-MEA	Forward	5'- ATGTCTGGTGGGAAACAACATAACGC A-3'
	R-MEA	Reverse	5'- CTAGTGAGTAATCGCATGTTGCTTCT CCAATG-3'
MEA com sítios <i>attB</i> (Gateway)	F-MEA-GW	Forward (<i>attB</i> 1)	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCA GGCTTCGAAGGAGATAGAATGCTGG TGGGAAACAACATAACGC-3'
	R-MEA-GW	Reverse (<i>attB</i> 2)	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTCCTAGTGAGTAATCGCATGTTGC- 3'

Vermelho: sítio de recombinação *attB*. Azul: sequência *Shine Dalgarno*. Verde: sequência MEA. O códon iniciador ATG está sublinhado na sequência *forward* e o códon de parada CTA está sublinhado na sequência *reverse*.

4.7.3 Clonagem

Após a amplificação e purificação da sequência codificadora de MEA contendo o sítio de recombinação *att* foi realizada a etapa de clonagem conforme a metodologia Gateway®. A figura 16 representa o esquema do vetor doador pDONR221 (ID 43-0117, Invitrogen) e vetor de destino pEXP1-DEST (43-0112, Invitrogen) utilizado para a produção de MEAr (Invitrogen, 2003).

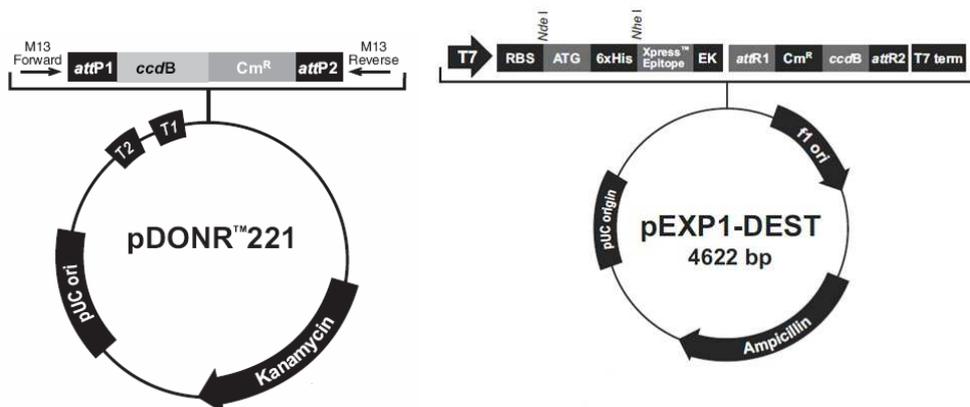


Figura 16: Desenho esquemático do vetor doador pDONR221 e vetor de destino pEXP1-DEST. Esses vetores foram utilizados para construção do clone de entrada e clone de expressão, respectivamente, para a produção de MEAr.

4.7.3.1 Reação de recombinação BP e obtenção do clone de entrada

A construção do clone de entrada para produção de MEAr foi realizada com a inserção da sequência de MEA contendo os sítios *attB* no vetor doador pDONR221 contendo os sítios *attP* através da reação de recombinação BP clonase (*Gateway BP Clonase II Enzyme mix*, Invitrogen). A reação se deu a partir 3 μL de pDONR221 150 ng/ μL , 150 ng do produto de PCR, 2 μL da BP clonase e 4 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 25°C por 16 h. Foi adicionado 1 μL da enzima proteínase K por 10 min a 37°C para parar a reação.

A transformação foi realizada com células competentes de subclonagem *E. coli* linhagem DH5 α (*5-alpha Competent E. coli C2987H*, NEB) seguindo as informações do fabricante com algumas modificações. O volume total da reação de recombinação (10 μL) foi adicionado a 50 μL de células competentes, incubadas 30 min em gelo seguido de 30 s em banho maria a 42°C, e por fim incubadas 5 min em gelo novamente. Após a transformação, as células foram cultivadas em 950 μL de meio SOC (Invitrogen) sob agitação (250 rpm) durante 60 min a 37°C. Um volume de 100 e 200 μL de bactérias foram plaqueadas em meio *Luria Bertani* (LB) ágar contendo canamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas a 37°C 16 h.

Dez colônias foram selecionadas para verificação da presença do inserto através do PCR de colônia utilizando o kit *OneTaq Quick-Load 2X Master Mix* (NEB). O experimento foi realizado em dupla seleção, de modo que para cada colônia fizemos uma reação de PCR utilizando o par de *primers* F-MEA-GW e R-MEA-GW e a outra utilizando o *primer* universal *forward* M13 (o sítio M13 está presente *upstream* ao início do sítio de recombinação, 5'-CGACGTTGTAAAACGGCCAGT-3') e o R-MEA-GW. Os parâmetros de amplificação foram uma etapa inicial de 94°C por 30 s, 35 ciclos com etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 58°C por 60 s, extensão a 68°C por 1 min e extensão final a 68°C por 1 min. O produto da reação foi submetido a gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e tamanho do fragmento. As colônias positivas foram inoculadas em 5 mL de meio *Terrific Broth* (TB) líquido contendo canamicina e cultivadas a 37°C 16 h sob agitação (250 rpm). Posteriormente, os plasmídeos recombinantes foram purificados através do kit *E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I* (Omega) conforme indicações do fabricante.

4.7.3.2 Reação de recombinação LR e obtenção do clone de expressão

A construção do clone de expressão para produção de MEAr foi realizada através da recombinação dos sítios *attL* que flanqueiam o gene de interesse no clone de entrada, e os sítios *attR* presentes no vetor de destino pEXP1-DEST através da reação de recombinação LR clonase (*Gateway LR Clonase II Enzyme mix*, Invitrogen). A reação LR foi constituída de 1 μL do clone de entrada 150 ng/ μL , 1 μL de pEXP1-DEST 150 ng/ μL , 8 μL da LR clonase, 4 μL de tampão da enzima e 6 μL de tampão TE. A reação foi incubada 25°C por 16 h. Foi adicionado 1 μL da enzima proteínase K por 10 min a 37°C para parar a reação. A transformação, seleção das colônias e purificação dos plasmídeos foram realizadas conforme item anterior. Para essa etapa o antibiótico de seleção foi ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o PCR de colônia foi realizado utilizando apenas os *primers* F-MEA-GW e R-MEA-GW. Os plasmídeos de expressão foram sequenciados pela empresa *Eurofins Genomics* pelo método de Sanger utilizando os *primers* específicos para MEA e T7 *terminator*. Os cromatogramas foram visualizados no software *SnapGene* e as sequências analisadas manualmente comparando com as sequências depositadas nos bancos de dados.

4.7.4 Expressão de MEAr

Após a análise do sequenciamento, células competentes de expressão BL21 (DE3) (*Singles™ Competent Cells*, Novagen) foram transformadas com o clone pEXP1-DEST-MEA conforme as informações do fabricante. Um nanograma de pEXP1-DEST-MEA foi adicionado a 50 μL de células competentes, incubadas 5 min em gelo seguido de 30 s em banho maria a 42°C, e por fim 2 min em gelo novamente. Após a transformação, as células foram cultivadas em 250 μL de meio SOC (Invitrogen) sob agitação (250 rpm) durante 60 min a 37°C. Volumes de 5, 20 e 50 μL de bactérias foram plaqueados em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cultivadas a 37°C 12 h. O pré-inoculo foi realizado a partir da adição das colônias em 10 mL de meio TB líquido mais ampicilina (TB-Amp) e incubação 12 h a 37°C. Posteriormente 1 mL foi adicionado em 100 mL de TB-Amp e este foi incubado em diferentes condições para avaliar a expressão da proteína de interesse. O crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro 600 nm até a densidade óptica

(DO) alcançar 0,4 a 0,6 para iniciar indução da expressão proteica com isopropil tio- β -D-galactosídeo (IPTG). Antes da indução 1 mL de meio foi coletado denominada amostra não induzida (T0). O IPTG (Ludwig Biotec) foi adicionado nas concentrações 0,2 e 1 mM. As condições de indução foram 1 mM/30°C/4 h, 1mM/37°C/3 h, 0,2 mM/28°C/16 h. Foram coletadas alíquotas após 1, 2 e 3 h de indução (T1, T2, e T3) para realização da cinética de expressão. As alíquotas (T0-T3) foram centrifugadas 20.000 rpm 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 300 μ L de *Lysis buffer I* (973 μ L *Cellytic B*, 5 μ L PIC, 20 μ L lisozima 0,2 mg/mL, 2 μ L benzonase U/mL). O lisado foi novamente centrifugado e o sobrenadante (proteínas solúveis) separado do precipitado (proteínas insolúveis). Ambos foram submetidos a análise por SDS-PAGE 12% e WB anti cauda de histina (WB-his). A técnica de WB-his foi realizada conforme item 4.5.1 com modificações: 5 μ g de MEAr, anticorpo primário anti cauda de histidina 1:5000 (ID 9469933, Ge Halthcare) e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:7000 (ID SC-358923, Santa Cruz Biotechnology).

4.7.5 Purificação de MEAr

Após confirmação da expressão da proteína e padronização do protocolo de indução, a etapa de produção foi realizada em volumes de 1000 mL. O meio de cultura foi centrifugado 10.000 xg 30 min a 4°C, o *pellet* ressuscitado e sonificado em 40 mL de tampão de lise (50 mM Tris, 0,5M NaCl, 0,2 mM EDTA, 3% sucrose, 1% TritonX-100). O sobrenadante foi recuperado e filtrado em filtro 0,22 μ m e submetido à purificação em coluna de afinidade Ni-NTA (Thermo Scientific) utilizando diferentes concentrações de imidazol (ligação: 10 mM, lavagem: 25/100 mM, eluição: 500 mM). As frações foram coletadas, agrupadas e dialisadas contra PBS. O produto foi concentrado em tubo *Amicon* 30 kDa (Millipore) e a quantificação proteica realizada pelo método de BCA.

4.8 Aplicação de MEAr no diagnóstico da esquistossomose

A proteína MEAr foi aplicada no teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG em amostras sorológicas humanas (IgG-ELISA-MEAR). Para a padronização do teste foram empregadas 65 amostras negativas e 93 amostras positivas. As amostras negativas foram

provenientes de indivíduos não residentes de área endêmica (grupo NN, item 4.3.1.3) enquanto as positivas foram de indivíduos residentes em áreas de baixa endemicidade do norte de Minas Gerais: Pedra Preta, Tabuas e Estreito de Miralta (grupo FC, item 4.3.1.1). Uma extensa avaliação parasitológica foi adotada em cada área como referência para validação das amostras. Após padronização do IgG-ELISA-MEAR, ele foi aplicado em diferentes grupos de estudo para analisar a validade do teste no diagnóstico da esquistossomose. A figura 17 apresenta um fluxograma da divisão dos grupos de amostras.

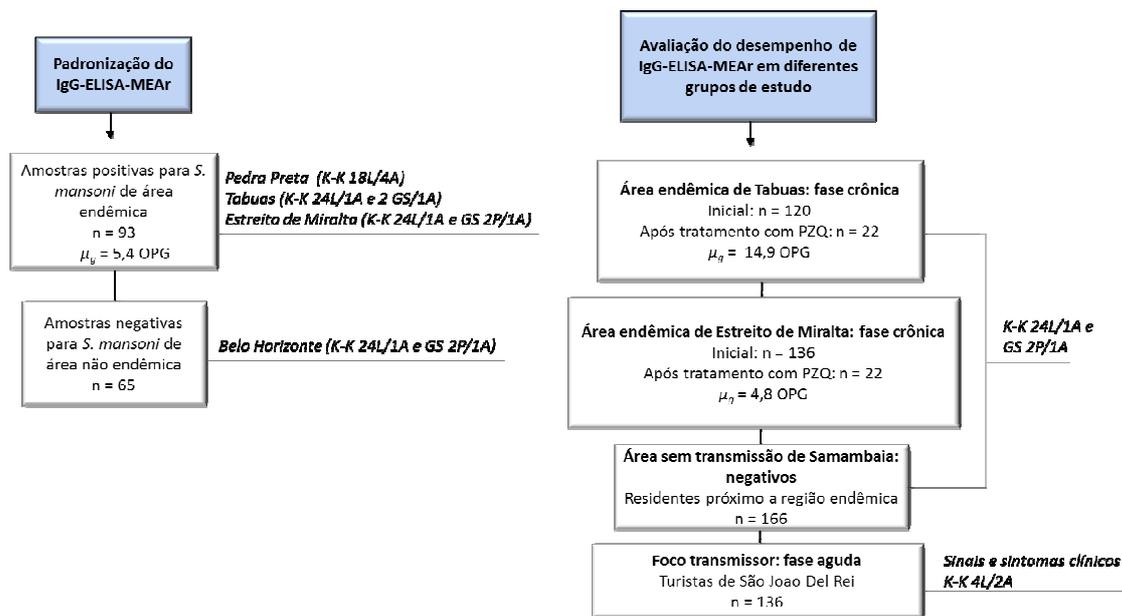


Figura 17: Fluxograma das amostras utilizadas na aplicação de MEAR do diagnóstico da esquistossomose. K-K: Kato Katz. GS: Gradiente Salínico. A: Amostra. P: Procedimento. μ_g : Média geométrica.

4.8.1 Definição dos parâmetros do ensaio IgG-ELISA-MEAR

Placas de poliestireno de fundo chato foram sensibilizadas com 100 μL /poço de MEAR nas concentrações 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e mantidas a 4°C por 16 h. As placas foram lavadas três vezes com PBS 0,05% Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 μL /poço de solução de bloqueio (2,5% de proteínas do leite em PBS-T) a 37°C por 1 h. As placas foram novamente lavadas e o soro humano adicionado em duplicata nas diluições 1:100 e 1:400 e incubadas a temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, foram adicionados 100 μL /poço do anticorpo conjugado a peroxidase (A0170, Sigma) diluído 1:60000 em PBS-T e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Por fim, 100 μL /poço de tetrametilbenzina (TMB, Invitrogen) foram adicionados como substrato e após 10

min, a reação foi finalizada com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Após definição dos parâmetros, a repetitividade preliminar do ensaio foi estimada através da execução do teste por três operadores diferentes em dias diferentes. O coeficiente de variação (CV) foi calculado através da fórmula abaixo. Coeficientes abaixo de 15% são recomendáveis e abaixo de 20% considerados aceitáveis (Crowther, 2001).

$$CV = \left(\frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \right) \times 100$$

4.8.2 Índices utilizados na avaliação do desempenho do IgG-ELISA-MEAr

A partir das médias das absorbâncias das amostras negativas e positivas, foi construída a curva ROC para IgG-ELISA-MEAr. A área sob a curva (ASC) foi considerada como indicador global de eficiência do teste. Um teste de diagnóstico com perfeita discriminação entre positivos e negativos tem ASC de 1 (S = E = 100 %) (Obuchowski *et al.*, 2004). Os pontos de cortes (PC) foram selecionados a partir da curva ROC com diferentes combinações de sensibilidade e especificidade. A seleção teve como partida o ponto representado pelo valor situado mais próximo ao ângulo superior esquerdo da curva. Esse ponto está relacionado a um número menor de resultados falso negativos e falso positivos, ou seja, um balanço da sensibilidade e especificidade. Os resultados para cada PC foram dispostos em tabela de contingência 2 x 2 (Tabela 3) juntamente com os resultados do método de referência (detecção de ovos nas fezes) para cálculo da sensibilidade (S) ou verdadeiros positivos (VP), especificidade (E) ou verdadeiros negativos (VN), falso positivos (FP), falso negativos (FN) e acurácia (ACC). O PC que apresentou maior acurácia foi selecionado na avaliação do IgG-ELISA-MEAr no diagnóstico de diferentes grupos de estudo (infecção aguda e crônica, fase pós tratamento e negativos residentes de área endêmica).

Tabela 3: Tabela de contingência 2 x 2 para cálculo dos índices de acurácia diagnóstica

		Teste de Referência (detecção direta de ovos nas fezes)		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA (detecção IgG)	Positivo	a (VP)	b (FP)	a+b
	Negativo	c (FN)	d (VN)	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

VP: Verdadeiro positivos. VN: Verdadeiro negativos. FP: Falso positivos. FN: Falso negativos.

$$\text{Sensibilidade (S)} = a / (a+c)$$

$$\text{Especificidade (E)} = d / (b+d)$$

$$\text{Acurácia (ACC)} = (VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)$$

As taxas de positividade por IgG-ELISA-MEAR foram calculadas e avaliadas em relação ao teste de referência quanto à concordância pelo coeficiente Kappa e significância entre as proporções pelo teste de McNemar ($p \leq 0,05$).

Taxa de Positividade: A taxa de positividade foi obtida pelo número de indivíduos positivos para *S. mansoni* por cada técnica ou combinadas dividido pelo total de indivíduos analisados.

Índice Kappa: Para a determinação do grau de concordância entre os métodos diagnósticos foi utilizado o índice Kappa o qual varia de 0 – 1 (Landis e Koch, 1977) conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Grau de concordância segundo Landis e Koch*

Kappa	Grau de concordância
< 0,00	<i>Poor</i>
0,00-0,20	<i>Slight</i>
0,21-0,40	<i>Fair</i>
0,41-0,60	<i>Moderate</i>
0,61-0,80	<i>Substantial</i>
0,81-1,00	<i>Almost perfect</i>

* Fonte (Landis e Koch, 1977)

4.8.3 Intensidade de infecção

A intensidade da infecção foi estimada em ovos por grama (opg) de fezes. De acordo com a classificação da OMS os níveis de intensidade de infecção são divididos em: (1) baixa intensidade: 1-99 opg, (2) moderada ou média: 100 - 399 opg e (3) alta: ≥ 400 opg (WHO, 2011). Para a técnica de K-K, o opg foi obtido pela média aritmética do número de ovos encontrado em cada lâmina, multiplicado pelo fator de correção 24, isto porque cada lâmina de K-K tem capacidade para 41,7 mg ($41,7 \times 24 = 1000$ mg ou 1 grama). Nas análises de 24 lâminas, o opg foi calculado pela soma do número de ovos encontrado em cada lâmina. Para o GS, o opg foi calculado pela soma do número de ovos encontrado em cada procedimento (2×500 mg = 1000 mg ou 1 g).

4.8.4 ELISA para detecção de IgG específicos para SEA (IgG-ELISA-SEA) e antígenos solúveis de verme adulto (IgG-ELISA-SWAP)

As técnicas IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP (Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013) foram realizadas em paralelo com IgG-ELISA-MEAR para comparação do desempenho. Os vermes foram recuperados através da perfusão do sistema porta-hepático e os ovos dos fígados de camundongos infectados. Ambos foram triturados conforme item 4.4.1 para extração do extrato solúvel. O ELISA foi realizado conforme item 4.8.1 seguindo os seguintes parâmetros: 1 µg/mL de extrato para a sensibilização, 1:100 de soro diluído e 1:60000 de anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase.

4.9 Análise estatística

O banco de dados foi organizado no programa Microsoft Office Excel 2010. Os índices de desempenho dos ELISAs em comparação ao teste de referência foram calculados em tabela de contingência 2 x 2 formulada no Excel.

O programa GraphPad Prism versão 5.0 foi utilizado para determinação da significância entre grupos com intervalo de confiança (IC) 95% e elaboração dos gráficos. A análise de normalidade foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados paramétricos entre 2 grupos de amostras independentes foi utilizado o teste *t* não pareado e para amostras dependentes (antes e após o tratamento) o teste *t* pareado. Na análise não paramétrica entre 2 grupos de amostras independentes foi utilizado o teste de Mann-Whitney e entre 3 grupos o teste de Kruskal-Wallis.

O programa GraphPad Prism também foi utilizado para fazer a regressão linear entre a carga parasitária (opg) e DO com intervalo de confiança de 95%, as curvas ROC para determinação dos PC e ASC, e o teste de McNemar (IC: 95%) para comparação das proporções de positividade entre o ELISA e o método de referência. O programa MedCalc versão 18.2.1 foi utilizado para comparação entre as curvas ROC dos ELISAs. A determinação do índice Kappa para análise da concordância entre o ELISA e o método de referência foi realizada através do programa on-line OpenEpi versão 3.03.

5 RESULTADOS

5.1 WB-SEA empregando amostras murinas e humanas

O WB-SEA foi realizado para avaliar a antigenicidade do extrato utilizando amostras humanas e murinas. Primeiramente, as amostras humanas dos grupos NN, FA, FC, TTO e HT, foram analisadas individualmente (Figura 19). As amostras murinas foram analisadas em *pool* de 15 amostras obtidas em diferentes tempos de infecção (T0, T7, T14, T21, T28, T35, T42, T49, T56 e T68) (Figura 18). As bandas com alta reatividade e comum em ambas análises (humana e murina) foram 12 e 13 kDa, 20 kDa, 50 kDa nas duas fases de infecção (aguda e crônica).

Na análise humana, foram apresentadas diferenças em número, intensidade e frequência das frações reconhecidas entre os pacientes dentro da mesma fase da infecção. Isso pode estar relacionado a fatores como o tempo de infecção no hospedeiro, a carga parasitária individual, a resposta humoral específica de cada indivíduo e, ainda, propriedades intrínsecas do soro (Cesari *et al.*, 2005).

As bandas de 12, 13 e 50 kDa foram identificadas em amostras murinas a partir dos 40 dias de infecção (T42), quando ocorre a oviposição, correlacionando com o resultado das amostras humanas em fase aguda (aproximadamente 60 dias de infecção) (Figura 18). A banda de 20 kDa se mostrou mais acentuada nas amostras humanas de fase crônica em comparação a aguda. Na análise murina essa mesma banda se torna mais intensa tardiamente (T56 e T68), corroborando com a análise humana. A banda de 20kDa demonstrou queda da reatividade na análise pós tratamento (Figura 19D) e menor índice de reação cruzada com outros helmintos (Figura 20).

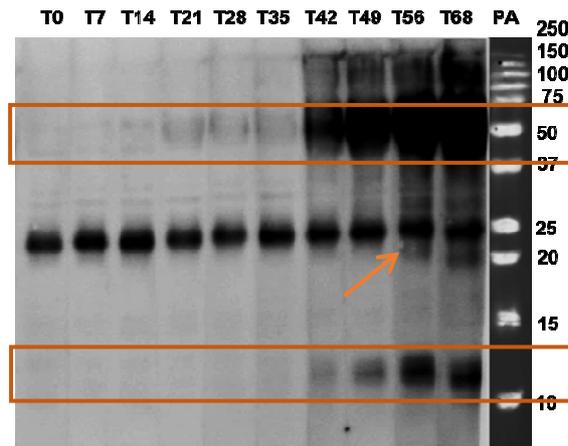


Figura 18: Frações imunorreativas detectadas por WB-SEA em *pool* de amostras murinas. 10 µg de SEA foi separado por SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de PVDF. O *pool* de soros murinos do T0 ao T68 foram adicionadas na diluição 1:200 e o conjugado anti-IgG murino 1:20000. Os retângulos indicam as bandas de 50 kDa e 12/13 kDa. A seta indica a banda de 20 kDa. PA: Padrão de amostra. T: Tempo após infecção.

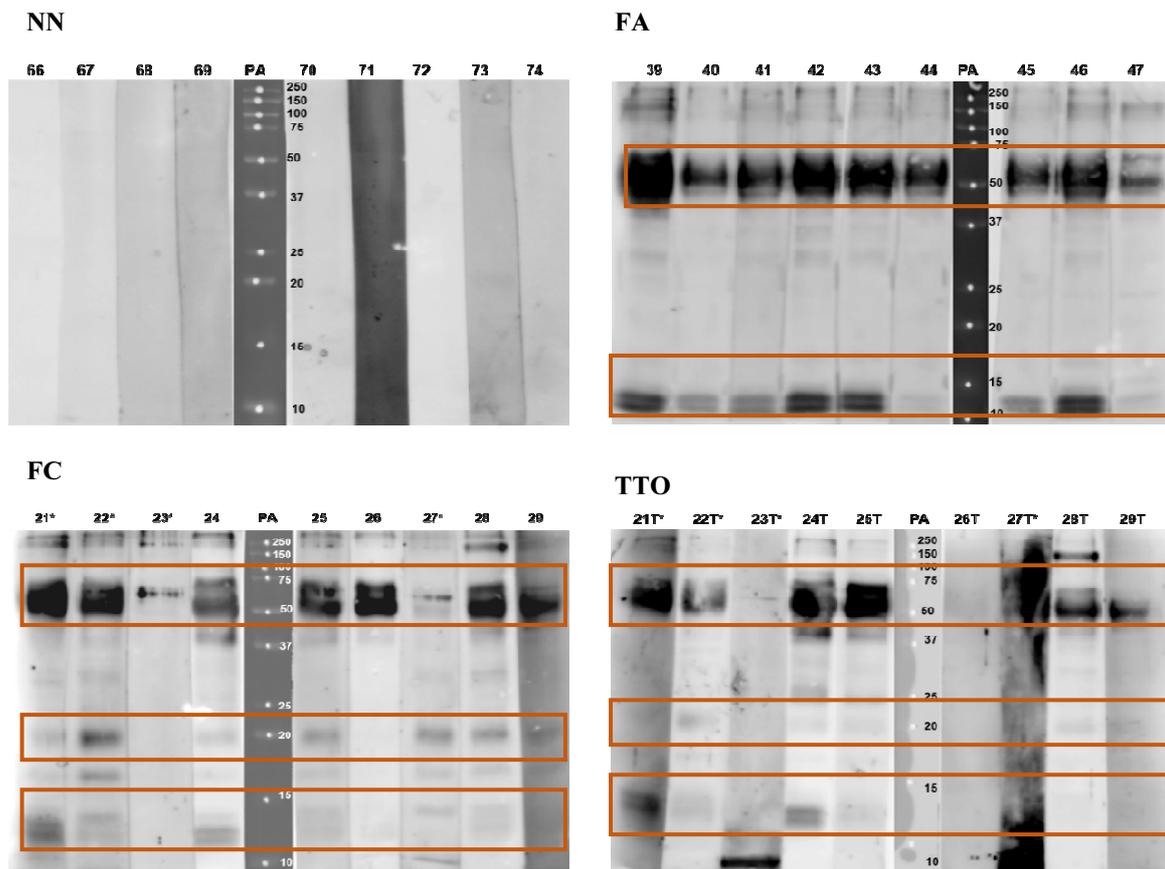


Figura 19: Frações imunorreativas detectadas por WB-SEA em amostras de indivíduos em diferentes fases de infecção. 2,4 µg de SEA foi separado por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. As amostras de soro dos grupos negativos (NN), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e após 180 dias do tratamento (TTO) foram adicionadas nas diluições 1:100 e o conjugado anti-IgG humano 1:150000. Os retângulos indicam as bandas de 50 kDa, 20 kDa e 12/13 kDa. Padrão de amostra. NN: Negativo de área não endêmica. FA: Fase aguda. FC: Fase crônica. TTO: 180 dias após tratamento. T: Tempo após a infecção.*: co-infecção com outros helmintos.

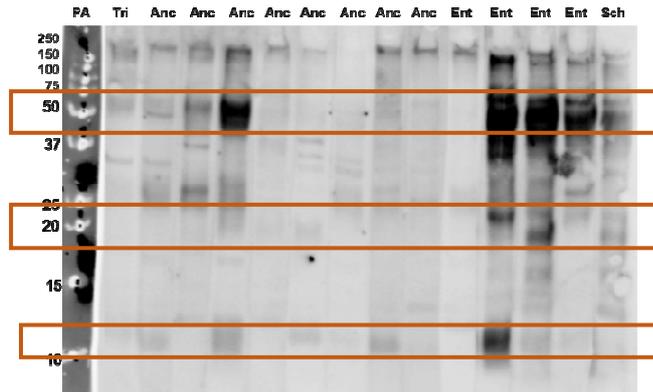


Figura 20: Frações imunorreativas detectadas por WB-SEA em amostras de indivíduos infectados por diferentes helmintos. 10 µg SEA foi separado por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. As amostras de soro foram adicionadas nas diluições 1:600 e o conjugado anti-IgG humano 1:100000. Os retângulos indicam as bandas de 50 kDa, 20 kDa e 12/13 kDa. PA: Padrão de amostra. Tri: *Trichuris trichiura*. Anc: Ancilostomídeos. Ent: *Enterobius vermicularis*. Sch: *S. mansoni*.

5.2 Análises imunoproteômicas

5.2.1 Caracterização do extrato por eletroforese

O SEA foi produzido conforme descrito no item 4.4.1 sendo posteriormente precipitado por TCA-acetona a fim de obter um extrato nas condições adequadas para a análise bidimensional (2D-PAGE). Essa técnica é altamente dependente do grau de solubilização das proteínas no tampão de reidratação e da ausência de compostos interferentes. Os 2D-PAGEs foram obtidos a partir de fitas de IPG de faixas de pH 3-10, uma vez que essa faixa resulta em uma boa separação dos *spots* como já descrito anteriormente (Ashton *et al.*, 2001; Curwen *et al.*, 2004). A figura 21 apresenta o perfil 1D (Figura 21A) e 2D-PAGE (Figura 21B, C) antes e após precipitação com TCA-acetona.

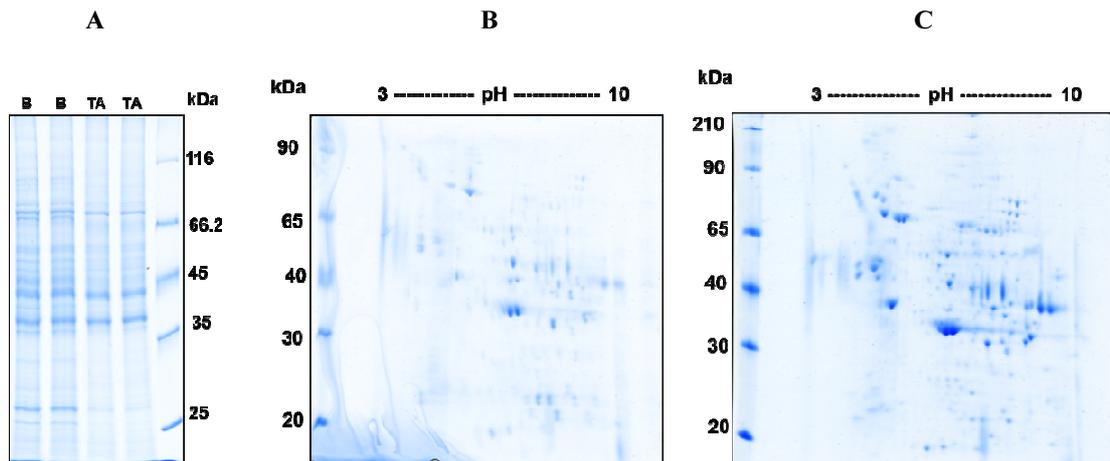


Figura 21: Perfil eletroforético 1D (A) e 2D do SEA bruto (B) e precipitado por TCA-acetona (C). 10 μ g de SEA foram separadas por SDS-PAGE 12% (A) e 60 μ g foram separadas utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados por Azul de Coomassie Colloidal. B: Extrato bruto solúvel. TA: Extrato precipitado com TCA-acetona

Na análise unidimensional (Figura 21A), as frações na faixa de 25 kDa não foram reconhecidas após a precipitação com TCA-acetona. Entretanto, o extrato foi utilizado nessas condições, uma vez que no 2D-PAGE uma maior quantidade de *spots* foram detectados com melhor definição (sem arrastes) após precipitação com TCA-acetona. Isso se deve possivelmente à eliminação de interferentes e, conseqüentemente, maior reprodutibilidade e resolução do extrato.

5.2.2 Padronização do WB unidimensional

Após estabelecida a separação do extrato, WB unidimensional foi realizado com *pool* de amostras murinas (Figura 22A) e humanas (Figura 22B) para padronização das concentrações nessas condições. A imunorreatividade dos *pools* de cada grupo de amostras está apresentada na figura 22 com suas respectivas diluições.

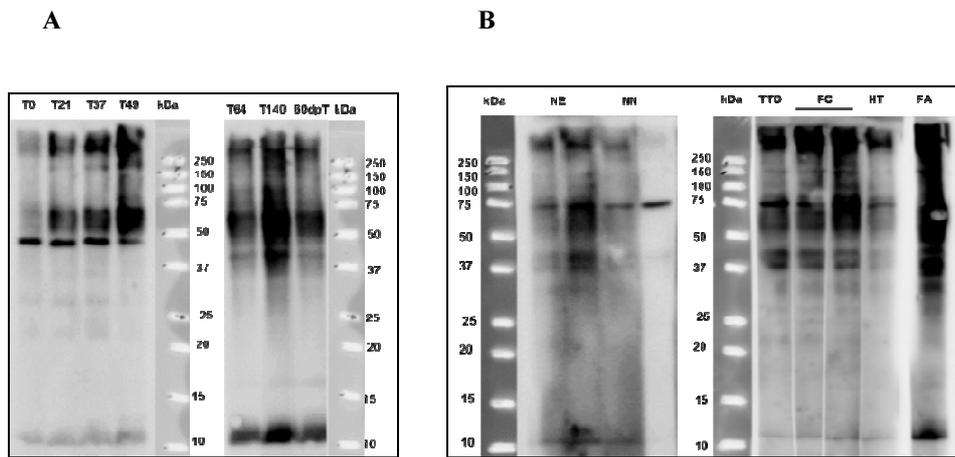


Figura 22: Padronização do WB após precipitação do extrato por TCA-acetona utilizando *pool* de amostras murinas (A) e humanas (B). 10 μ g SEA foi separado por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. O *pool* de soros murinos em todos os tempos foi adicionado na diluição 1:200 e o conjugado anti-IgG murino 1:20000. O *pool* de soros humanos foi adicionado nas diluições 1:600 (NE, NN, FC, TTO, HT) e 1:1200 (FA) e o conjugado anti-IgG humano 1:100000. NE: Negativos residentes próximos a áreas endêmicas. NN: Negativo de área não endêmica. FC: Fase crônica. FA: Fase aguda. TTO: 180 dias após tratamento. HT: Helmintos. T: Tempo após a infecção.

Para deglicosilar efetivamente o SEA de maneira a preservar seus epítopos polipeptídicos, a padronização da concentração de metaperiodato de sódio também foi realizada por WB (Figura 23). A oxidação diminuiu a imunorreatividade dos soros contra o extrato, demonstrando a existência de porções glicídicas imunogênicas. Entretanto, a porção polipeptídica também se mostrou reativa quando os carboidratos não foram mais reconhecidos. Esse resultado confirmou a presença de epítopos proteicos favorecendo a estratégia de produção de antígenos recombinantes em sistema heterólogo de bactéria. A concentração definida para a análise 2D foi 10mM de metaperiodato de sódio.

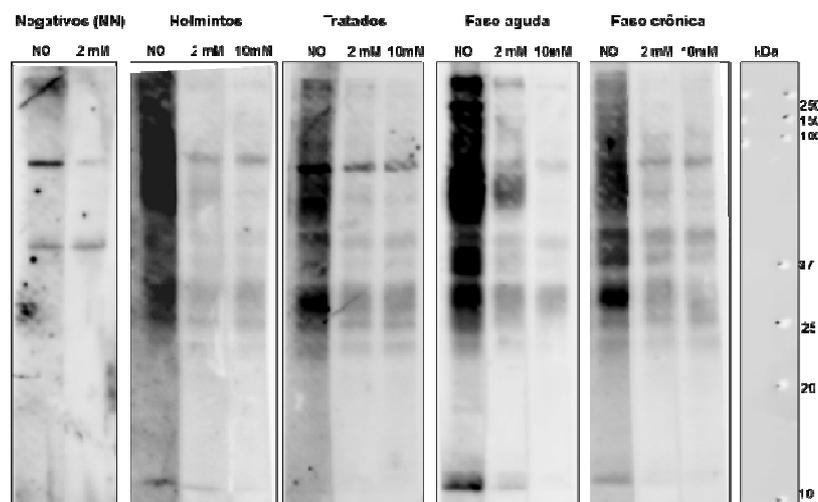


Figura 23: Deglicosilação do SEA com metaperiodato de sódio. 10 μ g SEA foi separado por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. 2 e 10 mM de metaperiodato de sódio foram adicionados, seguidos do *pool* de soros humanos e o conjugado anti-IgG humano. A reação foi revelada com o kit Ecl e a imagem capturada em LAS4000. NO: Não oxidado. NN: Negativos de área não endêmica.

5.2.3 Seleção de proteínas reconhecidas pelas amostras sorológicas humanas no WB-2D

A seleção de antígenos candidatos para o diagnóstico de *S. mansoni* se deu através WB-2D utilizando o *pool* das amostras humanas utilizadas na padronização no item 5.2.2 e o SEA precipitado por TCA-acetona. Para cada membrana revelada, um gel representativo foi corado com Azul de Coomassie a fim de realizar a sobreposição com a membrana revelada de WB e extrair os *spots* de interesse. A figura 24 apresenta o gel representativo (A), a membrana de WB sem a ação do metaperiodato de sódio (B) e a membrana após oxidação das porções glicídicas (C) dos grupos das amostras FA, FC, TTO, HT e NE.

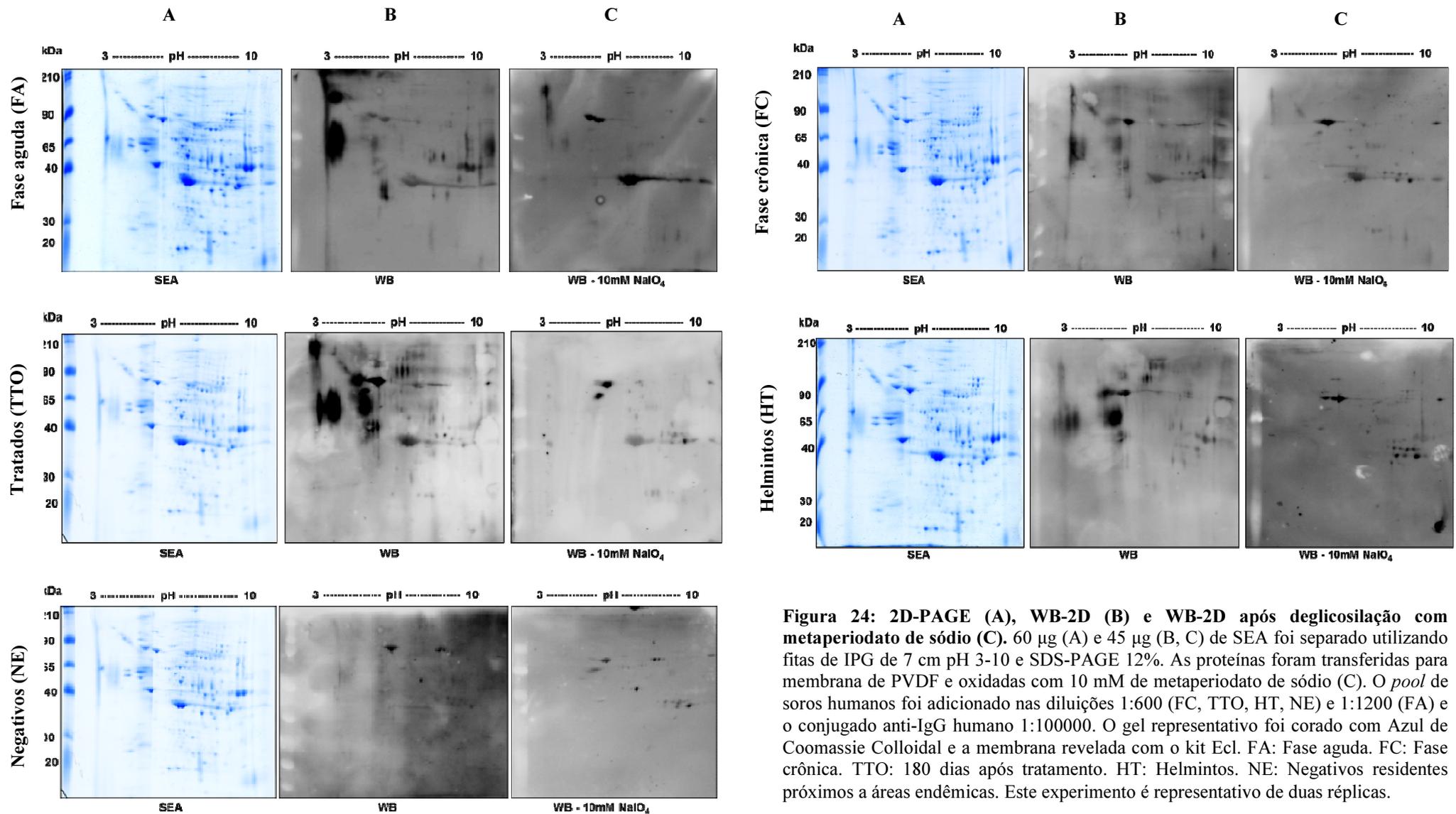


Figura 24: 2D-PAGE (A), WB-2D (B) e WB-2D após deglicosilação com metaperiodato de sódio (C). 60 μg (A) e 45 μg (B, C) de SEA foi separado utilizando fitas de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e oxidadas com 10 mM de metaperiodato de sódio (C). O *pool* de soros humanos foi adicionado nas diluições 1:600 (FC, TTO, HT, NE) e 1:1200 (FA) e o conjugado anti-IgG humano 1:100000. O gel representativo foi corado com Azul de Coomassie Colloidal e a membrana revelada com o kit Ecl. FA: Fase aguda. FC: Fase crônica. TTO: 180 dias após tratamento. HT: Helmintos. NE: Negativos residentes próximos a áreas endêmicas. Este experimento é representativo de duas réplicas.

Os 2D-PAGEs (representativo e transferido) foram realizados simultaneamente e sob as mesmas condições. A imagem do 2D-PAGE foi sobreposta pela membrana de WB a fim de realizar a correspondência do *spot* imunorreativo com o *spot* corado por Azul de Coomassie. Os *spots* imunogênicos ao *pool* de soros de pacientes infectados com *S. mansoni* (fase aguda e fase crônica) foram identificados e excisados do 2D-PAGE para análise por espectrometria de massas. Anteriormente ao tratamento com metaperiodato de sódio, 23 *spots* foram imunorreativos no WB-2D e estão identificados na figura 25 e listados na tabela 4.

A maioria dos *spots* imunorreativos no WB foram visualizados no 2D-PAGE correspondente. Alguns *spots* foram fracamente visualizados no gel, mas foram altamente imunogênicos no WB (*spot* 1). Por outro lado, existem proteínas muito expressas, cujos *spots* foram fortemente corados no 2D-PAGE, que não foram reconhecidos no WB. A maioria das proteínas identificadas foram relacionadas a *housekeeping proteins*, ou seja, proteínas envolvidas na manutenção básica das células como metabolismo energético (via glicolítica), composição estrutural (actina) e barreira química.

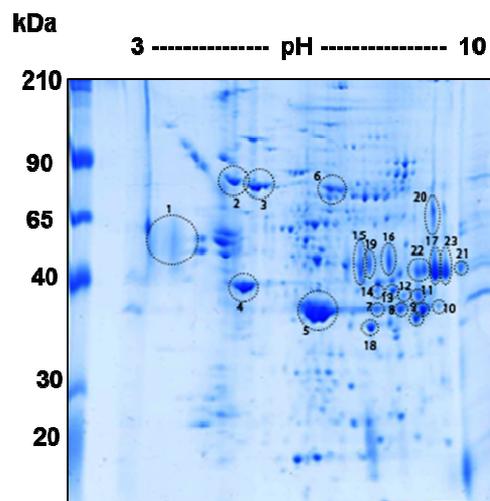


Figura 25: Representação dos *spots* reconhecidos nos experimentos de WB-2D. 60 μ g de SEA foram separados utilizando fita de IPG de 7 cm pH 3-10 e SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados por Azul de Coomassie Colloidal. Os *spots* imunorreativos no WB-2D pelo *pool* de soros FA e FC foram excisados do respectivo 2D-PAGE para identificação por espectrometria de massas. Os *spots* estão numerados e listados na Tabela 3. Este experimento é representativo de duas réplicas.

Tabela 4: Proteínas imunorreativas identificadas nos experimentos de 2D-WB.

Spots	No. de acesso	Proteína	No. de peptídeos únicos	No. de peptídeos totais	Massa teórica (kDa)	Função Biológica	Abundância relativa (%)
1	Smp_170410.1	NADH: ubiquinona oxirredutase	7	7	29,2	ME	43,23
2	Smp_049550.1	Proteína reguladora de glicose 78 kDa	17	20	71,2	CH	62,99
3	Smp_106930.1	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70)	24	27	69,8	CH	60,50
4	Smp_183710.1	Actina	4	13	41,7	EST	97,80
5	Smp_049250.1	Major egg antigen	14	15	37,0	CH	82,78
6	Smp_005880.1	Fosfoenolpiruvato carboxilase	27	27	70,3	ME	26,25
7	Smp_056970.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	3	3	36,4	ME	61,32
8	Smp_056970.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	9	9	36,4	ME	100,00
9	Smp_056970.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	12	12	36,4	ME	100,00
10		*					
11	Smp_150240.1	Glicoproteína secretora k5	3		31,1	-	100,00
12	Smp_079920.1	Piruvato desidrogenase	2	2	44,0	ME	100,00
13	Smp_042160.1	Aldolase	8	8	35,4	ME	100,00
14	Smp_042160.1	Aldolase	1	1	35,4	ME	71,07
15	Smp_179260.1	Alfa galactosidase	15	23	108,4	ME	66,73
16	Smp_179250.1	Alfa galactosidase	2	10	47,7	ME	61,69
17	Smp_150240.1	Glicoproteína secretora k5	3	3	31,1	-	100,00
18	Smp_035270.1	Malato desidrogenase citosólica	12	12	31,3	ME	89,31
19		*					
20		*					
21		*					
22	Smp_150240.1	Glicoproteína secretora k5	3	3	31,1	-	94,00
23	Smp_150240.1	Glicoproteína secretora k5	2	2	31,1	-	100,00

ME: Metabolismo energético. CH: Chaperona. BQ: Barreira química. EST: Estrutural. *: Identificação não realizada.

5.2.4 Comparação do perfil de reconhecimento das amostras sorológicas humanas de indivíduos infectados com *S. mansoni* e demais grupos antes e após a deglicosilação

Dentre os 23 *spots* identificados nos grupos de indivíduos infectados, ou seja, fase aguda e fase crônica, nenhuma proteína foi diferencialmente reconhecida entre eles. Desse total, 22 foram simultaneamente reconhecidos pelo grupo de indivíduos infectados com outros helmintos e 10 por amostras de indivíduos negativos (Tabela 5). Apenas um *spot*, número 5, identificado como a proteína *Major Egg Antigen* (MEA), localizado em uma posição de aproximadamente 40 kDa e pH 7, foi reconhecido pelos grupos de fase aguda e fase crônica, e ausentes no grupo dos outros helmintos e negativos. Esta também foi visualizada no grupo de indivíduos tratados, o que é comum uma vez que essa triagem é baseada na busca de anticorpos. Deve-se levar em consideração que após 180 dias do tratamento há um declínio do nível de anticorpos, mas não suficientes para exclusão total.

Uma vez que um dos objetivos desse trabalho é produzir antígenos recombinantes em sistema procarioto, o extrato foi submetido à ação do metaperiodato de sódio para avaliar se a reatividade seria proveniente da porção proteica ou da porção glicídica de uma glicoproteína. Este tratamento modifica a porção glicídica das glicoproteínas imobilizadas nas membranas de PVDF eliminando a reatividade imunológica que um carboidrato pode apresentar, sem alterar a estrutura da cadeia polipeptídica (Woodward *et al.*, 1985). Houve um decréscimo da imunorreatividade dos *spots* após deglicosilação das proteínas. Após a oxidação, dos 22 *spots* reconhecidos simultaneamente entre pacientes infectados com *S. mansoni* e outros helmintos, 11 não foram mais visualizados após a reação do metaperiodato de sódio, sugerindo que a antigenicidade dos mesmos é proveniente de porções glicídicas. Os 11 restantes mantiveram reativos, sendo 10 deles simultâneos as amostras negativas. O *spot* 5 manteve o reconhecimento anterior, sendo o único específico para infecção de *S. mansoni*, ausente de reações cruzadas com outros grupos e, ainda, apresentou diminuição da intensidade após tratamento terapêutico. A confirmação de epítomos proteicos de MEA demonstrou o potencial no desenvolvimento de um novo imunodiagnóstico para esquistossomose, visto que a proteína é passível de ser produzida a partir da tecnologia recombinante em bactérias.

Tabela 5: Comparativo dos *spots* imunogênicos aos *pools* de soro identificados no WB-2D antes e após a oxidação dos carboidratos pelo metaperiodato de sódio.

No. Spots	Proteína	Antes oxidação					Após oxidação				
		FA	FC	TTO	HT	NE	FA	FC	TTO	HT	NE
1	NADH: ubiquinona oxirredutase	X	X	X	X						
2	Proteína reguladora de glicose 78 kDa	X	X	X	X		X	X	X	X	
3	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	Actina	X	X	X	X						
5	Major egg antigen	X	X	X			X	X	X		
6	Fosfoenolpiruvato carboxilase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	Glicoproteína secretora k5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	Piruvato desidrogenase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	Aldolase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	Aldolase	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	Alfa galactosidase	X	X	X	X						
16	Alfa galactosidase	X	X	X	X						
17	Glicoproteína secretora k5	X	X	X	X						
18	Malato desidrogenase citosólica	X	X	X	X						
19	*	X	X	X	X						
20	*	X	X	X	X						
21	*	X	X	X	X						
22	Glicoproteína secretora k5	X	X	X	X						
23	Glicoproteína secretora k5	X	X	X	X						
No. de spots identificados por grupo		23	23	23	22	10	12	12	12	11	10

NE: Negativos residentes próximos a áreas endêmicas. FC: Fase crônica. FA: Fase aguda. TTO: Tratados. HT: Helmintos. *: Identificação não realizada. X: Presença de imunorreatividade. Vermelho: proteína selecionada para produção em sistema de expressão em procarioto.

5.3 Análise *in silico* da proteína selecionada

Na busca por um candidato que reproduza um diagnóstico sensível, específico, livre de reações cruzadas e ainda capaz para diferenciar infecções ativas, MEA foi selecionada para produção *in vitro*. Programas de bioinformática foram utilizados para descrever as características das sequências de DNA da proteína selecionada. MEA é uma proteína da família das proteínas de choque térmico (*heat shock protein - HSP*). Comparando a sequência de MEA com sequências de proteínas de helmintos e humanos através da ferramenta BLAST (NCBI), obtivemos o máximo de 30% de identidade, entre as quais estão proteínas da mesma família. Os dados do GeneDB mostraram evidências de expressão em outros estágios do ciclo de vida do parasito que estão presentes no hospedeiro vertebrado (Figura 26).

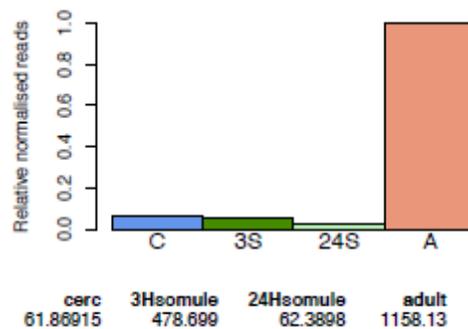


Figura 26: Expressão do transcrito MEA. Fonte: GeneDB. Cerc: Cercária. 3Hsomule: Esquistossômulo de 3 horas. 24Hsomule: Esquistossômulo de 24 horas. Adult: Verme adulto. Disponível em <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Schistosoma/mansoni/RNA-seq_plots/Smp_04/Smp_049250.pdf>. Acesso em 09 de novembro de 2016

A tabela 7 resume os resultados obtidos através de ferramentas disponíveis na internet para avaliar as características que fortalecem o uso no imunodiagnóstico. As predições quanto à solubilidade e ausência de domínios transmembrana foram concordantes, favorecendo as etapas posteriores de produção do antígeno recombinante. No entanto, as análises de localização e secreção foram indefinidas. Mesmo com os *scores* indicando ausência de peptídeo sinal e 58% de localização intracelular, o secretoma indicou a possibilidade de secreção por vias alternativas, independentemente da existência de peptídeo sinal. Esses parâmetros serão avaliados posteriormente com a produção do anticorpo monoclonal e captura direta do antígeno em amostras humanas.

Tabela 7: Análise *in silico* de MEA

Ferramenta	Predição	Análise
<i>SignalP 4.1</i> score \geq 0,4 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1)	Presença peptídeo sinal	Não
<i>SecretomeP</i> score \geq 0,5 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-2.0)	Secreção pela via não clássica	Sim
<i>TargetP</i> (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP)	Localização subcelular	Indefinido
TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)	Domínio transmembrana	Não
<i>SherLoc</i> (https://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc)	Localização	58% nuclear
<i>Harrier</i> (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)	Solúvel	Sim
<i>BCPred</i> score \geq 0,9 (http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/)	Epítomos célula B	6

5.4 Produção de MEAr

5.4.1 Amplificação e clonagem de MEA

O gene correspondente a MEA tem tamanho de 1005 pares de base (pb). A figura 27 apresenta o produto da amplificação a partir do cDNA com fragmento no tamanho esperado (aproximadamente 1 quilobase ou Kb). Esse produto foi purificado do gel de agarose e serviu como molde para amplificação da sequência de MEA com os sítios para clonagem na plataforma Gateway®. O tamanho esperado do gene MEA com os sítios *att* foi de 1048 pb (1005 da sequência de MEA + 27 do sítio *att* + 12 da sequência *Shine Dalgarno*). A figura 28 confirma a amplificação de um produto com peso de aproximadamente 1 Kb. O produto final então foi purificado por precipitação em etanol e os passos de inserção no vetor de entrada (pDONR) foram conduzidos.

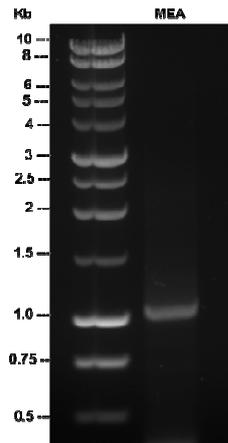


Figura 27: Perfil eletroforético da amplificação de MEA. 0,5 µg de cDNA de ovo de *Schistosoma mansoni* foi amplificado por PCR, o produto submetido a gel de agarose 1% e corado por brometo de etídio.

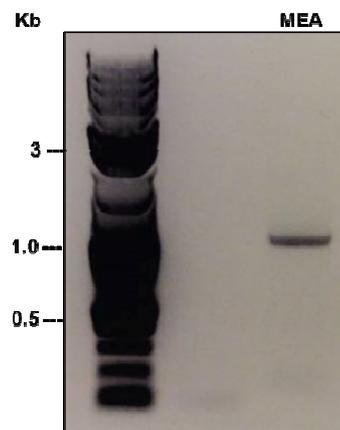
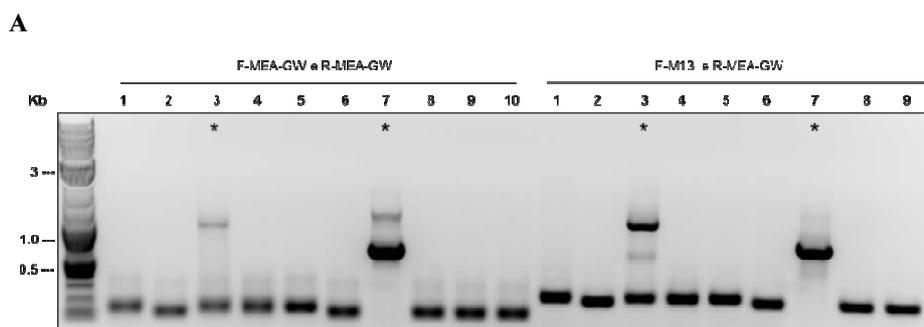


Figura 28: Perfil eletroforético da amplificação de MEA com sítios att. 0,5 µg de DNA de MEA foi amplificado por PCR, o produto submetido a gel de agarose 1% e corado por brometo de etídio.

A reação de recombinação BP foi realizada a partir do DNA de MEA contendo os sítios *att* e o vetor de entrada pDONR. Vinte colônias (10 de cada placa) foram submetidas ao método de PCR para confirmação da presença dos clones (Figura 29). O gel referente aos produtos de PCR apresentou 3 colônias positivas (peso aproximado de 1 kb) na dupla seleção (*primers* MEA e M13). Esses plasmídeos foram purificados e sequenciados, este último confirmando a presença do inserto.



B

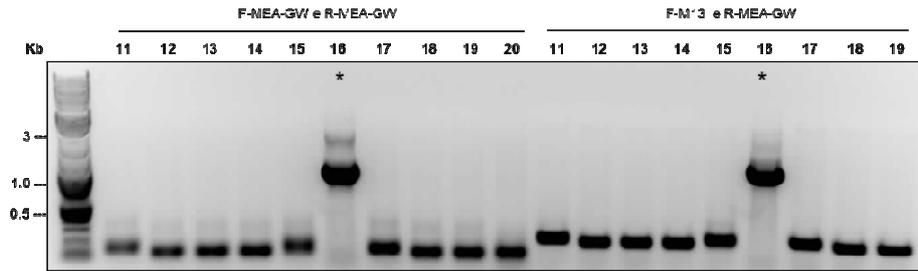


Figura 29: Perfil eletroforético dos clones de entrada. 10 colônias da placa 1 (A) e placa 2 (B) foram submetidas a PCR de colônia em dupla seleção para confirmação da presença do inserto. *: colônias positivas.

A reação de recombinação LR se deu através dos clones de entrada 3, 7 e 16 e o vetor de destino pEXP1-DEST. Dez colônias de cada reação foram rastreadas por PCR para seleção dos clones transformados, sendo 15 positivas (Figura 30). Essas colônias foram cultivadas e os plasmídeos purificados para sequenciamento. Dez plasmídeos (originados da recombinação do clone de entrada 6) foram transformados em bactérias de expressão BL21 e um selecionado para expressão.

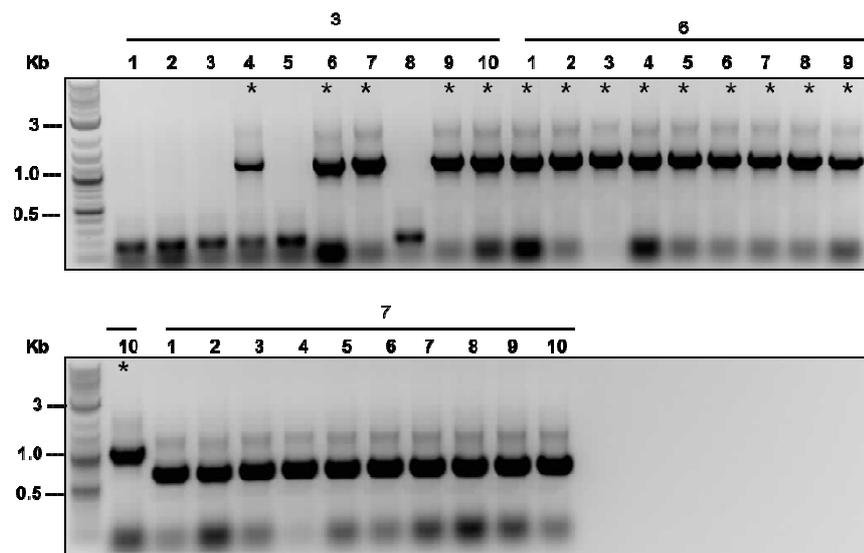


Figura 30: Perfil eletroforético dos clones de destino. 10 colônias de cada recombinação (3, 6 e 7) foram submetidas a PCR para confirmação da presença do inserto. *: colônias positivas.

5.4.2 Expressão e purificação de MEA

Primeiramente foi realizada uma predição do peso molecular de MEAr através do software *Expasy* (https://www.expasy.org/proteomics/protein_structure) o qual foi estimado em 43 kDa. A proteína MEA tem 334 aminoácidos os quais foram adicionados mais 47 aminoácidos provenientes da construção do vetor recombinante (43 aminoácidos do vetor de expressão pEXP1-DEST + 4 aminoácidos da sequência *Shine Dalgarno* adicionada no

primer) totalizando então em 381 aminoácidos (Figura 31). Para avaliação da expressão, uma etapa de teste foi realizada utilizando diferentes condições de indução com IPTG: 1 mM/30°C/4 h, 1mM/37°C/3 h e 0,2 mM/28°C/16 h. Alíquotas antes e após a indução foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE e WB-his para avaliar a expressão e solubilidade (Figura 32 e 33). A melhor condição foi definida como 1mM IPTG a 37°C por 3 a 4 h. O peso correspondente foi visualizado no SDS-PAGE em ambas as frações solúveis e insolúveis (Figura 32). O WB-his demonstrou que a maior disponibilidade da proteína está na fração solúvel além de confirmar que as outras condições de indução são inapropriadas para a expressão (Figura 33). De acordo com as condições definidas, a etapa de produção foi iniciada induzindo-se volumes de 1000 mL de LB.

The image shows a screenshot of a web browser displaying the ProtParam tool results. The browser address bar shows the URL: <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>. The page title is "ProtParam". Under "User-provided sequence:", the amino acid sequence is displayed in a grid format with residue numbers 10-380. Below the sequence, it states "References and documentation are available." At the bottom, the calculated properties are listed: "Number of amino acids: 381", "Molecular weight: 42396.21", and "Theoretical pI: 6.44".

ProtParam

User-provided sequence:

```

10      20      30      40      50      60
HRGSHHHHHH GPASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDHQTSLYKK AGFEGDRMSG GKQHNAVSIIP
70      80      90      100     110     120
VNREQRSFEK QRRDLLTGLE HGGGAHRGHS IAPYTEDWPS TVDMWIDSSW KRMDDOMRRL
130     140     150     160     170     180
RRGFALLVLS LAIQYSERMG SLDVPSTGSV NDFLKDAYEV GEDGKVHFKV RFDAQGFAPQ
190     200     210     220     230     240
DINVTSSENR VTMHAKKETT TDGRKCSREF CRMVQLPKSI DDSQLKCRHT DQGVLMLEAP
250     260     270     280     290     300
VKVDQMQSLT LNESGQVAVR PKSDNQIKAV PASQALVAKG VHGLSYVDDG SGGKRLHVEV
310     320     330     340     350     360
PVDPVYKPED LFMVVD5NRV VVSGRIHKQK SDQHGR555F AEF5QSYAIP ETVDPLSVSA
370     380
QVVGNTLVLE APLEKQMAIT H

```

References and documentation are available.

Number of amino acids: 381
Molecular weight: 42396.21
Theoretical pI: 6.44

Figura 31: Predição do peso molecular de MEAr (43 kDa). Análise realizada através do software *Expasy* (https://www.expasy.org/proteomics/protein_structure)

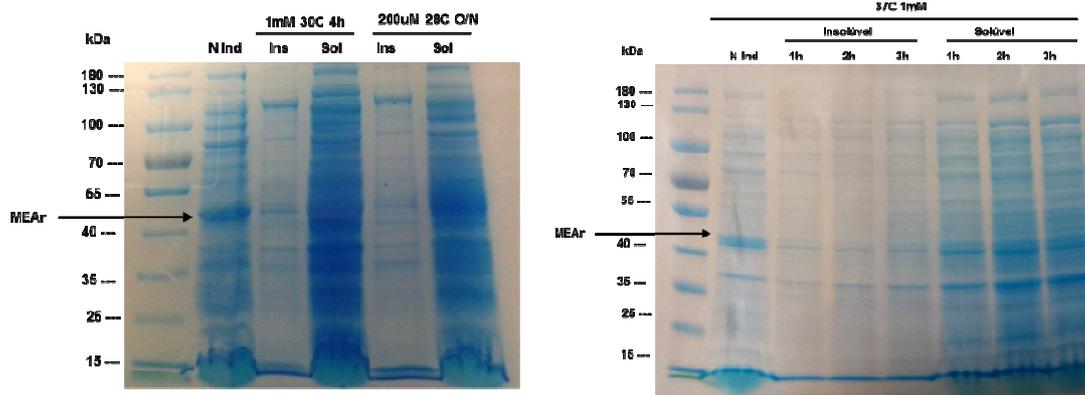


Figura 32: Perfil eletroforético dos produtos da expressão de MEAr. As condições de indução com IPTG foram: 1 mM/30°C/4 h, 1mM/37°C/3 h e 0,2 mM/28°C/ON. Aliquotas foram coletadas antes (N Ind) e após a indução (1/2/3 h) com IPTG e separadas em fração solúvel (Sol) e insolúvel (Ins). A seta indica o peso de MEAr (43 kDa). N Ind: Não induzido. ON: *Overnight*.

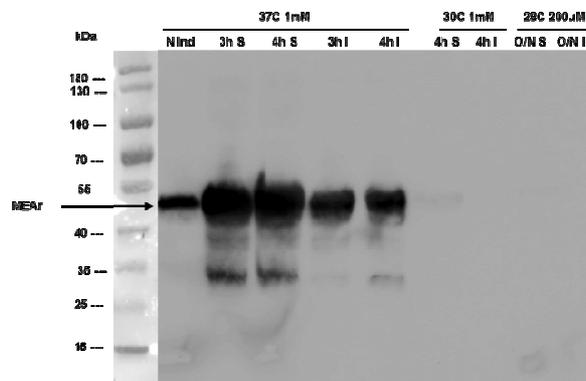


Figura 33: WB-his dos produtos da expressão de MEAr. As condições de indução com IPTG foram: 1 mM/30°C/4 h, 1mM/37°C/3 h e 0,2 mM/28°C/ON. Aliquotas foram coletadas antes (N Ind) e após a indução (3/4 h) com IPTG e separadas em fração solúvel (S) e insolúvel (I). A seta indica o peso de MEAr (43 kDa). N Ind: Não induzido. ON: *Overnight*.

As bactérias foram lisadas após indução e o sobrenadante (L1-L4, figura 34A) foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA. A eluição foi realizada com diferentes concentrações de imidazol e a presença de MEAr foi confirmada por SDS-PAGE e WB-his (Figuras 34B-C). As frações eluídas foram agrupadas e dialisadas em PBS. O rendimento foi 0,6 mg de MEAr por 1000 mL de meio induzido.

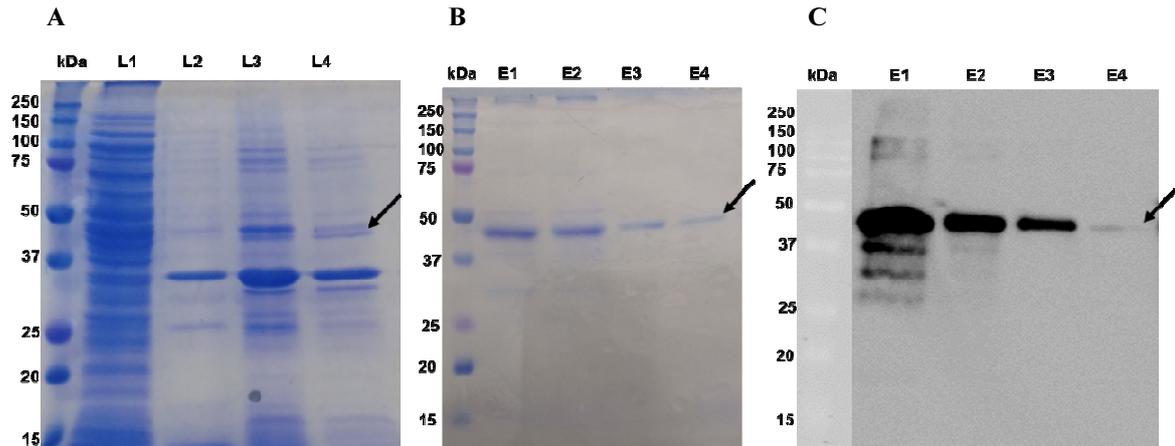


Figura 34: Produtos da purificação de MEAr. SDS-PAGE 12% após lise bacteriana (A) e após purificação em coluna de níquel Ni-NTA (B). WB-his após purificação em coluna de níquel Ni-NTA (C). As setas indicam o peso de MEAr (43 kDa). L: Lisado. E: Eluição.

Foram visualizadas bandas inespecíficas, entretanto a análise por espectrometria de massas utilizando a técnica de *shotgun* identificou 98,6% de abundância de MEA no produto purificado (Tabela 8). O único peptídeo correspondente a 1,4% se refere a uma proteína de *E. coli*. *Shotgun* é uma abordagem na qual uma maior resolução dos proteomas é possível, facilitando a identificação das proteínas menos abundantes, frequentemente perdidas quando utilizados os géis 2D.

Tabela 8: Identificação por espectrometria de massas (*Shotgun*) do produto final purificado

No. de acesso	Proteína	No. de peptídeos únicos	Massa teórica (kDa)	No. Aminoácidos	pI	Abundância relativa (%)
Smp_049250.1	Major egg antigen	16	37,0	334	6,96	98,60
Smp_106930.1	Proteína choque térmico homologa 70 kDa	1	69,8	637	5,58	1,40

pI: Ponto isoelétrico

5.5 Avaliação da antigenicidade de MEAr

A proteína recombinante MEAr foi avaliada quanto sua antigenicidade utilizando uma amostra de soro positivo de área endêmica (106 opg) e negativo de área não endêmica (Figura 35). Diferentes concentrações do antígeno foram utilizadas e a banda referente a MEAr (43 kDa) foi reconhecida com 5 μ g e 7 μ g.

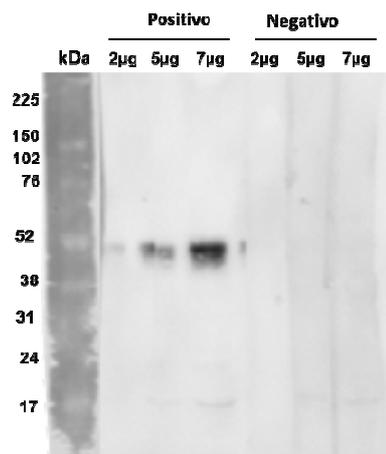


Figura 35: WB-MEAR utilizando amostra positiva e negativa para *S. mansoni*. 2, 5 e 7 µg de MEAr foi separado por SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de PVDF a 100V. Uma amostra positiva de área endêmica (106 opg) e negativa de área não endêmica foram adicionadas na diluição 1:800 e o conjugado anti-IgG humano 1:80000

5.6 Aplicação do IgG-ELISA-MEAR na detecção da esquistossomose mansoni

5.6.1 Avaliação do desempenho de IgG-ELISA-MEAR

Grupo de amostras

Amostras positivas (n = 93) e negativas (n = 65) validadas pelo teste de referência foram utilizadas para a padronização do IgG-ELISA-MEAR. As informações das amostras negativas estão descritas 4.3.1.3. As amostras positivas foram provenientes das localidades rurais de Montes Claros (Pedra Preta, Tabuas e Estreito de Miralta) as quais estão descritas no item 4.3.1.1.

O grupo foi composto por 52 homens e 41 mulheres, com idades de 5-80 anos e carga parasitária de 1 a 214 opg. A média geométrica da carga parasitária pela técnica de K-K do grupo selecionado foi 5,4 opg e mediana 4 opg. De acordo com a classificação da OMS existem três níveis de intensidade de infecção: baixa intensidade (1 – 99 opg), moderada (100 - 399 opg) e alta (\geq 400 opg) (WHO, 2011). Como 93,5% (87/93) dos indivíduos apresentaram baixa intensidade de infecção (< 100 opg), uma subclassificação dentro dessa faixa foi realizada e está descrita na tabela 9. Entre os 93 indivíduos, 64 (68,8%) possuíam

carga parasitária ≤ 10 opg. Ainda, desses 64, 29 possuíam carga de 1 opg. Os outros 6,5% apresentaram intensidade de infecção moderada (100, 105, 106, 149, 151 e 214 opg).

Tabela 9: Classificação dos indivíduos positivos utilizados na padronização de IgG-ELISA-MEAR

Carga parasitária (opg)*	Categoria	Total	
		n	%
≤ 10		64	68,8
11-25		12	12,9
26-50		3	3,2
51-99		8	8,6
≥ 100		6	6,5
Total		93	100,0

*opg calculado a partir do método de K-K (18L/4A, 24L/1A)

Parâmetros do ensaio

Duas diluições de soro (1:100 e 1:400) e duas concentrações de antígeno (1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$) foram empregadas. O conjugado anti-IgG humano foi adicionado 1:60000 conforme indicação do fabricante (A0170, Sigma). Os grupos dos indivíduos negativos e positivos mostraram diferenças significativas em todas as combinações (teste *t*, $p \leq 0,05$) (Gráfico 1). Os parâmetros definidos foram: diluição do soro 1:100 e concentração de MEAr 1 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que nessas condições uma maior amplitude de segregação entre os grupos positivos e negativos foi observada.

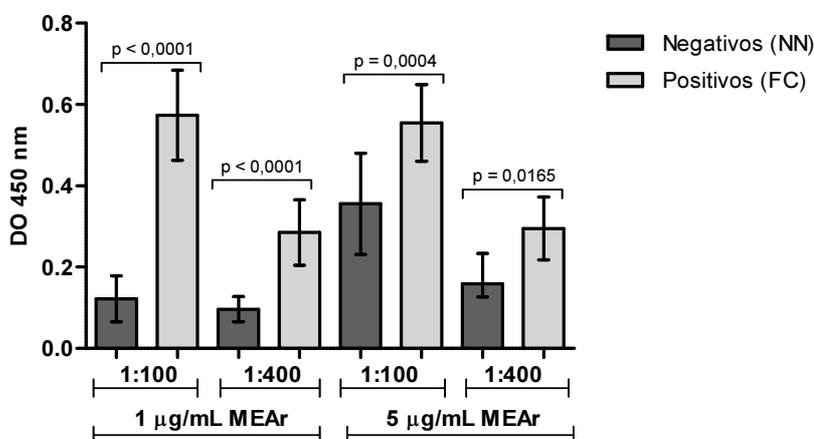


Gráfico 1: Padronização de IgG-ELISA-MEAR. A placa foi sensibilizada com 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de MEAr; adicionado 100 μL de amostras de soro positivo e negativo diluídas 1:100 e 1:400 em duplicata; conjugado anti-IgG humano 1:60000. Os valores estão apresentados a partir da média de cada grupo e as barras de erros indicam

o desvio padrão. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de p (teste t não pareado, IC: 95%). DO: Densidade óptica. NN: Negativos residentes de área não endêmica. FC: Positivos residentes de área endêmica.

A consistência dos resultados quando o exame se repete foi avaliada como uma estimativa preliminar da repetitividade. Evidências de repetitividade são indicadas na fase de padronização quando aplicações em um maior número de amostras é um objetivo. A tabela 10 apresenta o CV das amostras positivas e negativas testadas por três operadores diferentes. As amostras positivas tiveram CV = 8,08% e amostras negativas CV = 1,18%, ambas dentro do limite recomendável (< 15%) (Crowther, 2001).

Tabela 10: Coeficiente de variação das amostras positivas e negativas no estudo preliminar de repetitividade do IgG-ELISA-MEAR

Teste	Positivos (n = 93)	Negativos (n = 65)
OP 1	0,347	0,156
OP 2	0,295	0,154
OP 3	0,320	0,153
Média	0,321	0,154
Desvio Padrão	0,03	0,01
Coeficiente de Variação (%)	8,08	1,18

Coeficiente de variação calculado a partir da média das absorbâncias obtida por três operadores diferentes. OP: operador.

Curva ROC: Desempenho na discriminação de indivíduos positivos e negativos

O gráfico 2 apresenta as curvas ROC construída a partir das absorbâncias das amostras positivas e negativas para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP. Quanto mais perto a curva ficar localizada ao canto superior esquerdo e quanto maior for a ASC, melhor é o teste para discriminar entre doentes e não doentes. A ASC pode ter qualquer valor entre 0 e 1 de modo que um diagnóstico perfeito tem ASC de 1 ($S = E = 100\%$) (Obuchowski *et al.*, 2004). A ASC do IgG-ELISA-MEAR foi 0,9402 (IC: 90,71% a 97,33%), IgG-ELISA-SEA foi 0,9384 (IC: 90,35% a 97,33%) e IgG-ELISA-SWAP 0,9612 (IC: 93,55% a 98,69%). A $ASC > 0,90$ indica elevado desempenho do teste, ou seja, precisão satisfatória em discriminar duas populações distintas (positivos e negativos). A comparação entre as curvas ROC foi realizada segundo DeLong e colaboradores (1988) (Gráfico 2). IgG-ELISA-SWAP ($p = 0,2542$) e IgG-ELISA-SEA ($p = 0,9311$) não demonstraram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) em relação a IgG-ELISA-MEAR. O Gráfico 3 compara as absorbâncias entre MEAR e os antígenos brutos. A correlação entre a DO de MEAR e SWAP foi maior em relação ao SWAP ($r^2 = 0,73$ e $0,51$, respectivamente).

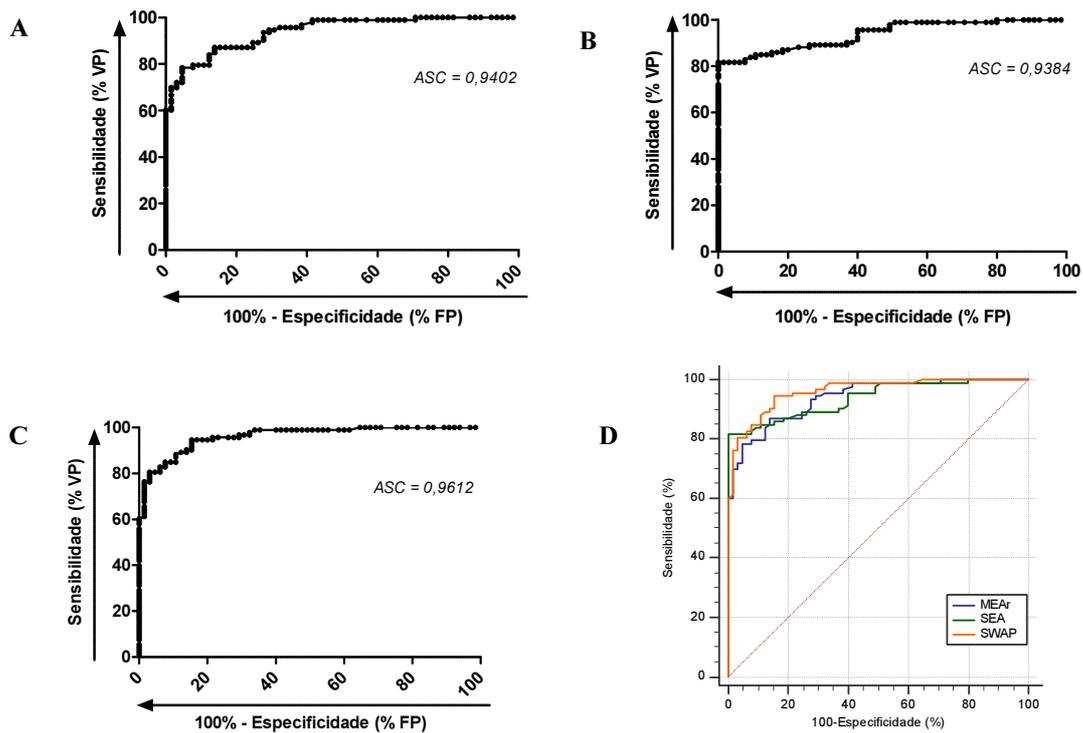


Gráfico 2: Curva ROC do IgG-ELISA-MEAR (A) IgG-ELISA-SEA (B) e IgG-ELISA-SWAP (C). Curva ROC calculada a partir da média das absorbâncias de 93 indivíduos positivos e 65 negativos. As setas demonstram de forma esquemática o sentido que aumenta a sensibilidade e a especificidade. ASC: Área sob a curva. FP: Falsos positivos. VP: Verdadeiros positivos.

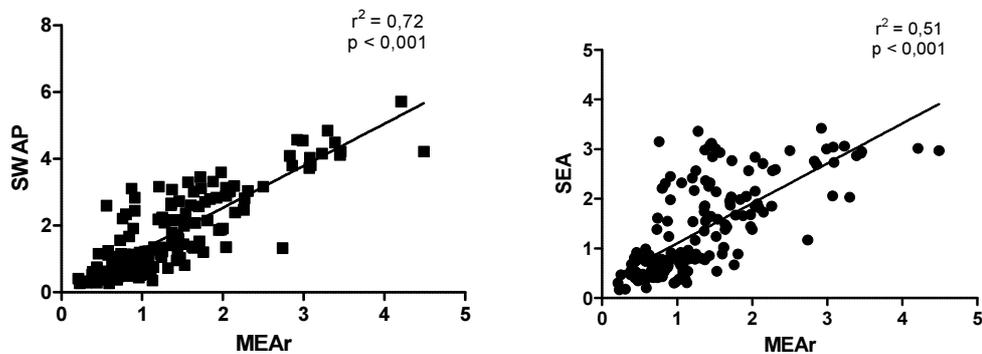


Gráfico 3: Regressão linear entre as absorbâncias de MEAr, SEA e SWAP no IgG-ELISA. Gráfico calculado a partir da média das absorbâncias de 93 indivíduos positivos e 65 negativos. IC: 95%.

Determinação dos pontos de corte e índices de desempenho

Após construção das curvas ROC, os gráficos de dispersão foram plotados demonstrando diferença significativa entre os indivíduos positivos de área endêmica (FC) e negativos de área não endêmica (NN) (Mann-Whitney, IC: 95%). Posteriormente alguns PCs foram selecionados baseados em diferentes combinações de sensibilidade e especificidade. Os resultados utilizando esses PCs foram organizados na tabela de contingência 2 x 2 e comparados ao teste de referência (K-K 18 L e 24 L) para determinação dos índices de desempenho (Tabela 11). Três PCs com o maior índice de acurácia foram pré-selecionados dentro de cada antígeno para uma avaliação preliminar. Os mesmos estão destacados na tabela 8 e representados no gráfico 4.

Tabela 11: Índices de desempenho do ELISA em relação ao K-K na discriminação de indivíduos positivos (n = 93) e negativos (n = 65)

	PC	S (VP)		E (VN)		FN		FP		ACC
		%	n	%	N	%	N	%	N	
IgG-ELISA-MEAR	0,195	93,55	87/93	72,31	47/65	6,45	6/93	27,69	18/65	84,81
	0,203	89,25	83/93	75,38	49/65	10,75	10/93	24,62	16/65	83,54
	0,225	87,10	81/93	84,62	55/65	12,90	12/93	15,38	10/65	86,08
	0,237	84,95	79/93	86,15	56/65	15,05	14/93	13,85	9/65	85,44
	0,255	79,57	74/93	92,31	59/65	20,43	19/93	9,23	6/65	84,18
	0,265	78,49	73/93	95,38	62/65	21,51	20/93	4,62	3/65	85,44
IgG-ELISA-SEA	0,185	89,25	83/93	73,85	48/65	10,75	10/93	26,15	17/65	82,91
	0,193	87,10	81/93	80,00	52/65	12,90	12/93	20,00	13/65	84,18
	0,202	84,95	79/93	84,62	55/65	15,05	14/93	15,38	10/65	84,81
	0,210	84,95	79/93	87,69	57/65	15,05	14/93	12,31	8/65	86,08
	0,216	83,87	78/93	90,77	59/65	16,13	15/93	9,23	6/65	86,71
	0,246	81,72	76/93	100,00	65/65	18,28	17/93	0,00	0/65	89,24
IgG-ELISA-SWAP	0,158	94,62	88/93	84,62	55/65	5,38	5/93	15,38	10/65	90,51
	0,172	90,32	84/93	86,15	56/65	9,68	9/93	13,85	9/65	88,61
	0,178	89,25	83/93	87,69	57/65	10,75	10/93	12,31	8/65	88,61
	0,180	88,17	82/93	89,23	58/65	11,83	11/93	10,77	7/65	88,61
	0,188	84,95	79/93	90,77	59/65	15,05	14/93	9,23	6/65	87,34
	0,200	80,65	75/93	95,38	62/65	19,35	18/93	4,62	3/65	86,71

PC: Ponto de corte. S: Sensibilidade. VP: Verdadeiro positivo. E: Especificidade. VN: Verdadeiro negativo. FP: Falso positivo. FN: Falso negativo. ACC: Acurácia

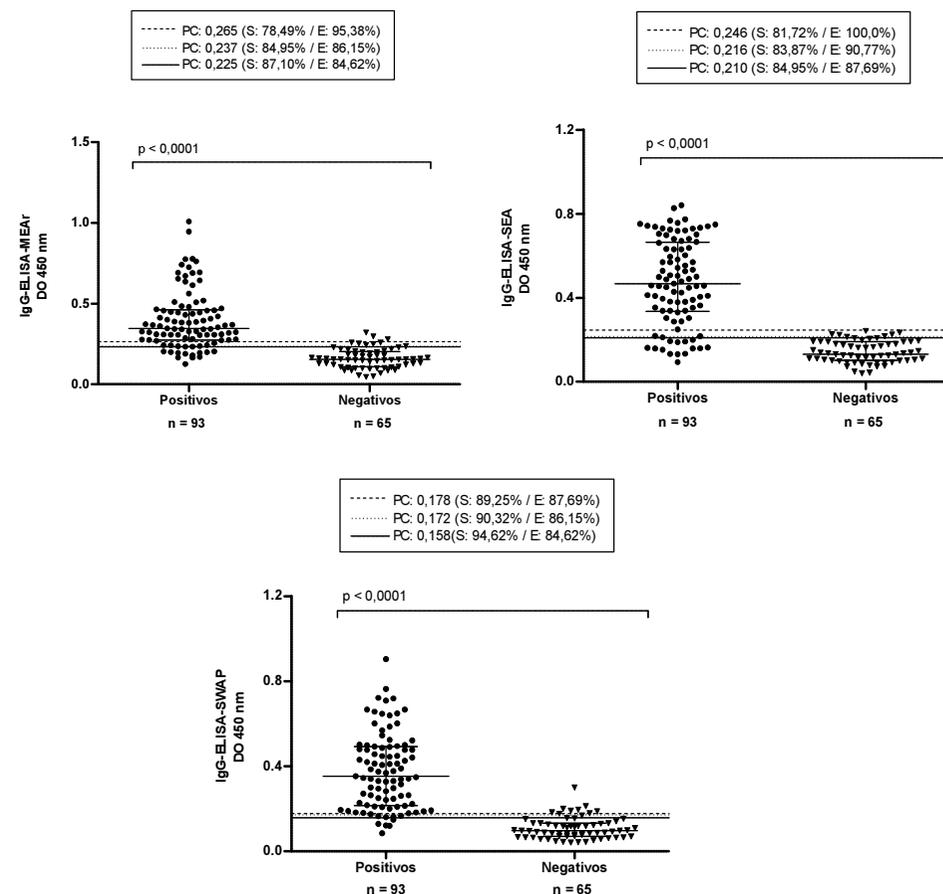


Gráfico 4: Dispersão do IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP. Valores calculados a partir da média das absorvâncias de 93 indivíduos positivos e 65 negativos. As linhas pontilhadas representam os PCs selecionados. As barras de erros indicam a mediana e os intervalos interquartis. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de p (Mann-Whitney, IC: 95%). DO: Densidade óptica. PC: Ponto de corte. S: Sensibilidade. E: Especificidade.

Como demonstrado na tabela 11, os PCs com maior sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) obtiveram uma menor especificidade (taxa de verdadeiros negativos). Conseqüentemente conduziram para a obtenção de um número menor de falso negativos e maior de resultados falso positivos. Dentro da pré-seleção, o PC que identificou maior número de verdadeiros positivos para IgG-ELISA-MEAR foi 0,225, para IgG-ELISA-SEA 0,210, para IgG-ELISA-SWAP 0,158. Entretanto nem sempre o teste mais sensível é o mais acurado. O índice de acurácia é baseado em todos os resultados verdadeiros desse modo é influenciado também pela taxa de verdadeiros negativos (especificidade) ($ACC = VP + VN / n \text{ total}$). Os PCs mais acurados apresentaram maior sensibilidade para IgG-ELISA-MEAR (PC: 0,225) e IgG-ELISA-SWAP (PC: 0,158). Para IgG-ELISA-SEA, o teste mais acurado foi relacionado ao PC 0,246 o qual a especificidade foi maior que a sensibilidade com 100% de detecção dos indivíduos negativos.

A detecção dos indivíduos positivos foi realizada separadamente baseada na carga parasitária utilizando os PCs pré-selecionados e está descrita na tabela 12. O grupo ≤ 10 opg representa 68,8% dos indivíduos positivos. Para o IgG-ELISA utilizando qualquer um dos antígenos, a priorização da sensibilidade na escolha do PC demonstrou relevância para o aumento da positividade nesse grupo. Dos 64 indivíduos com cargas ≤ 10 opg, foram identificados 56, 52, 59 indivíduos empregando MEAR, SEA e SWAP no IgG-ELISA considerando o PC com maior sensibilidade, respectivamente. O PC com maior sensibilidade no IgG-ELISA-MEAR apresentou melhor desempenho nos demais grupos (1-99) demonstrando uma maior taxa de positividade que os demais. No IgG-ELISA-SEA a sensibilidade e especificidade não influenciaram na taxa de positividade nos grupos acima de 10 opg. Resultado semelhante foi observado no IgG-ELISA-SWAP, entretanto a sensibilidade ainda foi relevante nos indivíduos até 25 opg.

Tabela 12: Sensibilidade de cada método de acordo com a carga parasitária obtida pelo método de referência*

Carga parasitária (opg)*	≤ 10		11-25		26-50		51-99		≥100		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IgG-ELISA-MEAR												
PC: 0,225 (S: 87,10%, E: 84,62%)	56/64	87,5	10/12	83,3	2/3	66,7	7/8	87,5	6/6	100,0	81/93	87,1
PC: 0,237 (S: 84,95%, E: 86,15)	54/64	84,4	10/12	83,3	2/3	66,7	7/8	87,5	6/6	100,0	79/93	84,9
PC: 0,265 (S: 78,49%, E: 95,38%)	49/64	76,6	9/12	75,0	2/3	66,7	7/8	87,5	6/6	100,0	73/93	78,5
IgG-ELISA-SEA												
PC: 0,210 (S: 84,95%, E: 87,69%)	52/64	81,3	10/12	83,3	3/3	100,0	8/8	100,0	6/6	100,0	79/93	84,9
PC: 0,216 (S: 83,87%, S: 90,77%)	51/64	79,7	10/12	83,3	3/3	100,0	8/8	100,0	6/6	100,0	78/93	83,9
PC: 0,246 (S: 81,72%, E: 100%)	49/64	76,6	10/12	83,3	3/3	100,0	8/8	100,0	6/6	100,0	76/93	81,7
IgG-ELISA-SWAP												
PC: 0,158 (S: 94,62%, E: 84,62%)	59/64	92,2	12/12	100,0	3/3	100,0	8/8	100,0	6/6	100,0	88/93	94,6
PC: 0,172 (S: 90,32%, E: 86,15%)	56/64	87,5	11/12	91,7	3/3	100,0	8/8	100,0	6/6	100,0	84/93	90,3
PC: 0,178 (S: 89,25%, E: 87,69%)	55/64	85,9	11/12	91,7	3/3	100,0	8/8	100,0	6/6	100,0	83/93	89,2

* opg calculado a partir do método de K-K (18L/4A, 24L/1A)

O PC com maior índice de acurácia para cada antígeno foi selecionado para determinação do diagnóstico dos grupos de estudo (áreas endêmicas e não endêmicas). Para IgG-ELISA-MEAR o PC foi 0,225 (S: 87,10%, E: 84,62%, ACC: 86,08%), IgG-ELISA-SEA foi 0,246 (S: 81,72%, E: 100%, ACC: 89,24%) e IgG-ELISA-SWAP foi 0,158 (S: 94,62%, E: 84,62%, ACC: 90,5%). Adotando esses parâmetros, IgG-ELISA-MEAR identificou 81/93 indivíduos positivos e conseqüentemente apresentou a maior taxa de falso negativos de 12,9% (12/93). Dos 65 indivíduos saudáveis, 55 foram identificados como negativos e 10 foram falso positivos. IgG-ELISA-SEA apresentou uma especificidade de 100% identificando todos os indivíduos negativos, entretanto sua sensibilidade foi inferior a IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SWAP com detecção de 76/93 dos indivíduos positivos. O teste mais acurado entre todos foi IgG-ELISA-SWAP com especificidade igual do IgG-ELISA-MEAR (84,62%), porém com maior sensibilidade e conseqüentemente menos número de falso negativos (5/93).

As taxas de positividade para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram 57,6%, 48,1% e 62%, respectivamente. A taxa de positividade do teste de K-K 24 L adotado como método de referência foi 58,9% e o K-K (2 L) foi 22,8% (Gráfico 5). A tabela 13 resume as tabelas 2 x 2 de cada IgG-ELISA adotando os PC selecionados com as taxas de positividade, índices de concordância e significância em relação ao teste de referência. O resultado do K-K (2 L) também foi incluído e comparado ao teste de referência para determinação dos índices de desempenho, uma vez que esse protocolo é a metodologia oficial adotada pela OMS na detecção de casos. Os resultados empregando os 3 antígenos apresentaram Kappa = 0,61-0,80 (*substantial agreement*). IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-

SWAP não apresentaram diferença significativa comparado ao teste de referência (McNemar, $p > 0,05$). IgG-ELISA-SWAP apresentou maior índice de concordância entre todos os teste (Kappa = 0,80). Além disso, esse teste foi o melhor da detecção de indivíduos com cargas 1-10 opg o qual representa 68,8% do grupo de amostras positivas (Gráfico 6). Quando IgG-ELISA-MEAr foi comparado com IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP o índice Kappa foi igual 0,57 e 0,60 (*moderate agreement*), respectivamente. O K-K (2 L) apresentou menor desempenho comparado a qualquer um dos testes de IgG-ELISA. A sensibilidade foi de 38,71% (36/93) conduzindo a maior taxa de falso negativos (61,3%, 57/93).

Tabela 13: Avaliação de desempenho do IgG-ELISA e K-K (2 L) na discriminação de indivíduos positivos (n = 93) e negativos (n = 65) para *S. mansoni*

		Método de referência (K-K 18/24 L)													
		Positivo				Negativo				Total					
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
IgG-ELISA-MEAR (0,225)	Positivo	81	87,1	10	15,4	91	57,6	IgG-ELISA-SEA (0,246)	Positivo	76	81,7	0	0,0	76	48,1
	Negativo	12	12,9	55	84,6	67	42,4		Negativo	17	18,3	65	100,0	82	51,9
	Total	93	58,9	65	41,1	158	100		Total	93	58,9	65	41,1	158	100
	Sensibilidade: 87,10% (78,55% a 93,15%) Especificidade: 84,62% (75,34% a 93,47%) Kappa = 0,71 p = 0,83						Sensibilidade: 81,72% (72,35% a 88,98%) Especificidade: 100% (94,48% a 100%) Kappa = 0,79 p = 0,0001								
IgG-ELISA-SWAP (0,158)	Positivo	88	94,6	10	15,4	98	62,0	K-K 2 L	Positivo	36	38,7	0	0,0	36	22,8
	Negativo	5	5,4	55	84,6	60	38,0		Negativo	57	61,3	65	100,0	122	77,2
	Total	93	58,9	65	41,1	158	100		Total	93	58,9	65	41,1	158	100
	Sensibilidade: 94,62% (87,90% a 98,23%) Especificidade: 84,62% (73,52% a 92,37%) Kappa = 0,80 p = 0,30						Sensibilidade: 38,71% (28,78% a 49,38%) Especificidade: 100,0% (94,48% a 100,0%) Kappa = 0,34 p < 0,0001								

Diferenças estatísticas representadas pelo valor de p (teste McNemar IC: 95%).

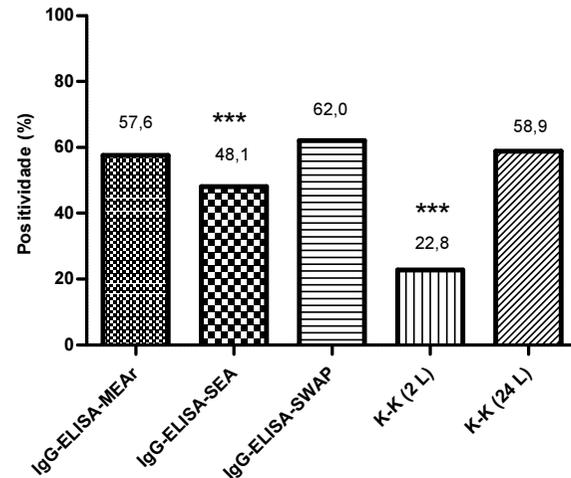


Gráfico 5: Taxa de positividade do IgG-ELISA e K-K. Valores calculados a partir da análise de 158 indivíduos (93 positivos de área endêmica e 65 negativos de área não endêmica). Diferenças estatísticas representadas pelo *(teste McNemar, IC: 95%, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001)

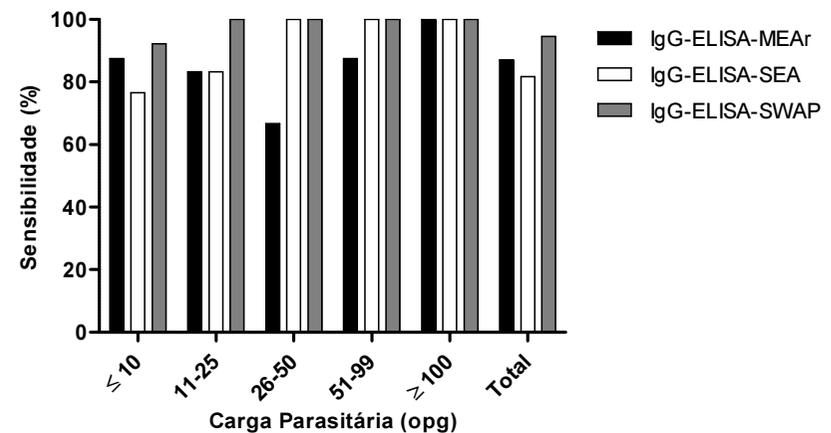


Gráfico 6: Sensibilidade de cada método considerando a carga parasitária (opg). Valores calculados a partir da análise de indivíduos positivos residentes de área endêmica (n = 93).

A análise de regressão foi utilizada para avaliar o comportamento da carga parasitária em relação a DO. A relação entre as duas variáveis foi positiva, porém baixa para os 3 antígenos. Foi observada diferença significativa para IgG-ELISA-SEA ($p = 0,0012$) e IgG-ELISA-SWAP ($p = 0,0012$) indicando que embora a relação entre opg e DO seja baixa ela não aconteceu ao acaso (Gráfico 7).

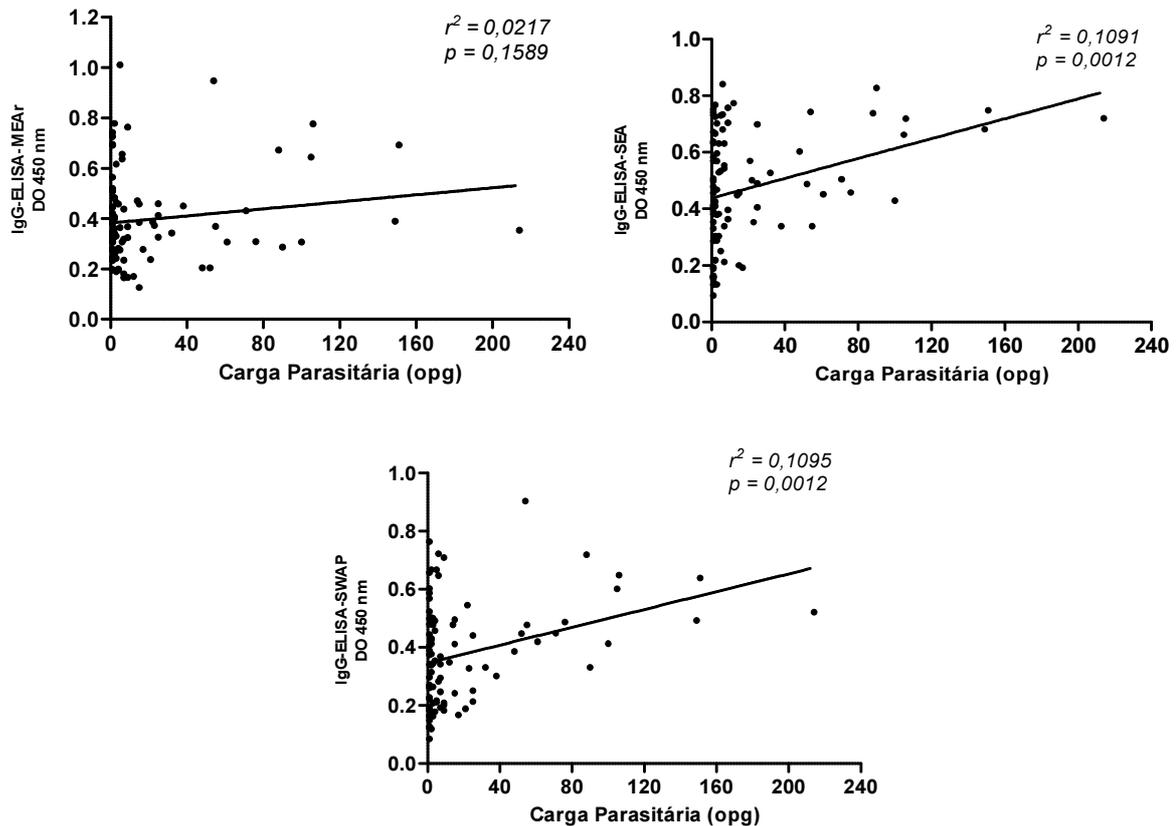


Gráfico 7: Regressão linear entre a carga parasitária (opg) e a DO do IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP. Gráfico calculado a partir da média das absorvâncias de 93 indivíduos positivos e carga parasitária em opg. Opg calculado a partir do método de K-K (18L/4A, 24L/1A). Opg: Ovos por grama de fezes. DO: Densidade óptica.

5.6.2 Validade diagnóstica em diferentes grupos de estudo

5.6.2.1 Fase crônica: Área endêmica de Tabuas

Grupo de indivíduos positivos e negativos de área endêmica

Utilizando os parâmetros definidos, o IgG-ELISA-MEAR, juntamente com o IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP, foram avaliados na discriminação de indivíduos positivos

e negativos residentes da área endêmica de Tabuas descrita no item 4.3.1.1. Fizeram parte da avaliação amostras sorológicas de 120 residentes, 61 homens e 59 mulheres, com idade entre 5-83 anos. As 65 amostras dos indivíduos negativos saudáveis foram adicionadas como controle (item 4.3.1.3). A taxa de positividade pelo teste de referência (K-K 24 L / 2 GS) foi 33,33% (40/120). A carga parasitária dos indivíduos foi de 1-508 opg, com média geométrica de 14,9 opg e mediana 14,5 opg. A classificação dos indivíduos positivos está descrita na tabela 14. De acordo com a classificação OMS, 82,5% de todos os indivíduos positivos possuíam baixa intensidade de infecção, 15% moderada intensidade de infecção e 2,5% alta intensidade de infecção (508 opg).

Tabela 14: Classificação dos indivíduos residentes de Tabuas pela carga parasitária

Carga parasitária (opg)*	Categoria	Total	
		n	%
≤ 10		18	45,0
11-25		7	17,5
26-50		4	10,0
51-99		4	10,0
100-399		6	15,0
≥ 400		1	2,5
Total		40	100

* opg calculado a partir do método de K-K (24 lâminas = 1000 mg) e GS (2 procedimentos = 1000 mg)

Desempenho do ensaio na discriminação de indivíduos positivos e negativos de área endêmica

Os 3 testes demonstraram diferenças significativas quando o grupo positivo foi comparado com o grupo negativo de área não endêmica (Kruskal-Wallis, IC: 95%). Entretanto, a discriminação entre indivíduos positivos e aqueles negativos residentes das áreas endêmicas não foi significativa para IgG-ELISA-MEAr e IgG-ELISA-SWAP ($p = 0,2270$ e $p = 0,2691$), apenas para IgG-ELISA-SEA ($p = 0,0004$) (Gráfico 8). A ASC utilizando as amostras dos indivíduos positivos e negativos da área foi 0,57, 0,70 e 0,56 para IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP, respectivamente. Por se tratar de uma detecção indireta (detecção de anticorpos) é comum que residentes possuem anticorpos circulantes sem infecção ativa.

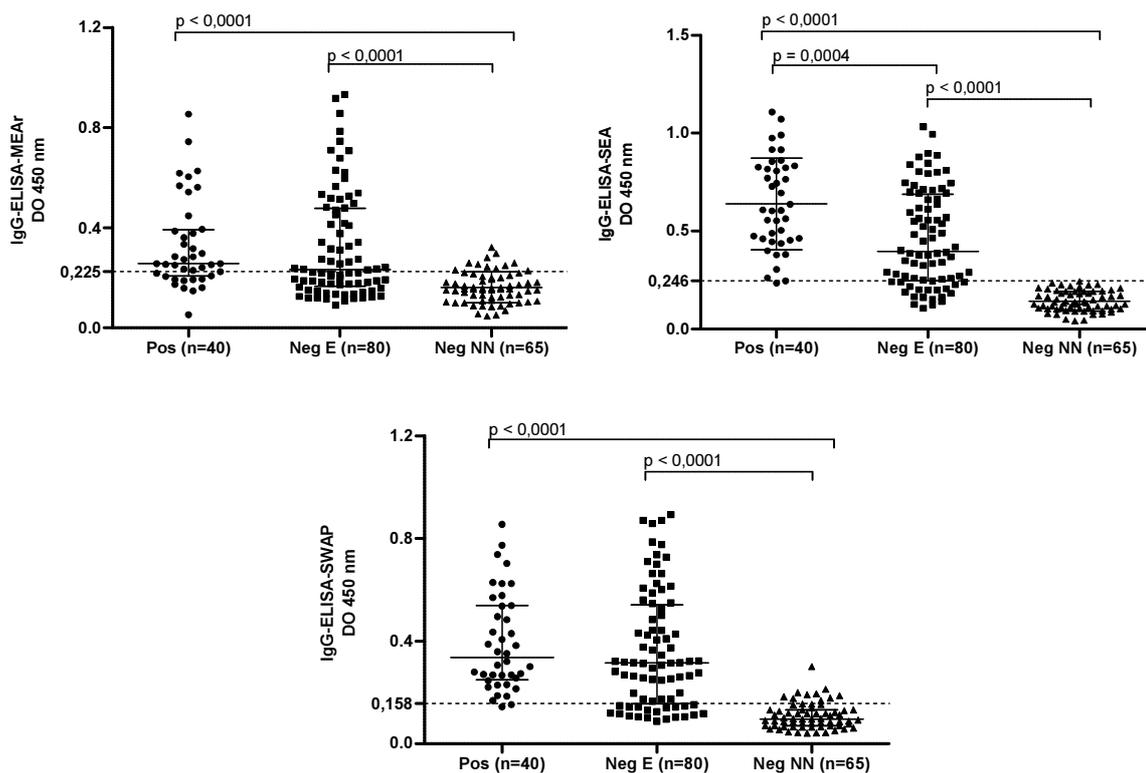


Gráfico 8: Desempenho do IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de residentes da área endêmica de Tabuas. Valores calculados a partir da média das absorvâncias de 40 indivíduos positivos (endêmicos), 80 negativos (endêmicos) e 65 negativos (não endêmicos). As linhas pontilhadas representam os PCs. As barras de erros indicam a mediana e os intervalos interquartis. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de p (Kruskal-Wallis, IC: 95%). DO: Densidade óptica. Pos: Positivos. Neg E: Negativos de área endêmica. Neg NN: Negativos de área não endêmica.

As taxas de positividade para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram 57,5%, 82,5% e 75,8%, respectivamente. A taxa de positividade do teste de K-K 24 L adotado como método de referência foi 33,3% e o K-K (2 L) foi 18,3% (Gráfico 9). A tabela 16 resume as tabelas 2 x 2 de cada teste com as taxas de positividade, índices de concordância e significância em relação ao teste de referência. Todos os testes apresentaram diferença significativa com o teste de referência ($p < 0,05$, McNemar, IC: 95%). IgG-ELISA-SWAP foi o único que apresentou Kappa = 0,22 (*fair agreement*) enquanto IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SEA apresentaram Kappa = 0,00 – 0,20 (*slight agreement*).

IgG-ELISA-MEAR apresentou a menor taxa de verdadeiro positivos (70%, 28/40) e consequentemente a maior taxa de falso negativos (30,0%, 12/40). Entretanto foi o teste com maior taxa de verdadeiros negativos 48,8 (39/80). IgG-ELISA-SEA apresentou a maior taxa de verdadeiro positivo (97,5%, 39/40), entretanto a maior taxa de falso positivos (75%, 60/80) com apenas 25% de verdadeiro negativos (20/80). IgG-ELISA-SWAP apresentou 95%

(38/40) de verdadeiro positivos e 33,8% (27/80) de verdadeiro negativos sendo o teste com melhor desempenho para essa área.

A tabela 15 apresenta a taxa de positividade por grupo de cargas. Nos grupos acima de 50 opg todos os testes detectaram 100% dos indivíduos. Nos grupos abaixo de 50 opg, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP apresentaram resultado superior ao IgG-ELISA-MEAR. IgG-ELISA-SEA apresentou melhor desempenho no grupo ≤ 10 opg com 100% (18/18) de detecção enquanto IgG-ELISA-MEAR apresentou 61,1% (11/18) de positividade. Na análise geral, IgG-ELISA-SEA demonstrou maior taxa de positividade entre os indivíduos que foram positivos no teste parasitológico alcançando 97,5% (39/40) de positividade (Gráfico 10).

Tabela 15: Taxa de positividade de Tabuas de acordo com a carga parasitária obtida pelo método de referência

Carga parasitária (opg)*	≤ 10		11-25		26-50		51-99		100-399		≥ 400		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
IgG-ELISA-MEAR	11/18	61,1	4/7	57,1	2/4	50,0	4/4	100,0	6/6	100,0	1/1	100,0	28/40	70,0
IgG-ELISA-SEA	18/18	100,0	6/7	85,7	4/4	100,0	4/4	100,0	6/6	100,0	1/1	100,0	39/40	97,5
IgG-ELISA-SWAP	17/18	94,4	6/7	85,7	3/4	75,0	4/4	100,0	6/6	100,0	1/1	100,0	37/40	92,5

* opg calculado a partir do método de K-K (24 lâminas = 1000 mg) e GS (2 procedimentos = 1000 mg)

Tabela 16: Avaliação de desempenho do IgG-ELISA e K-K (2 L) na discriminação de indivíduos positivos (n = 40) e negativos (n = 80) para *S. mansoni* residentes de Tabuas

		Método de referência (K-K 24 L + 2 GS)																											
IgG-ELISA-MEAR	Positivo			Negativo			Total			IgG-ELISA-SEA	Positivo			Negativo			Total			K-K 2 L	Positivo			Negativo			Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n		%	n	%	N	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	n	%	
Positivo	28	70,0	41	51,3	69	57,5	Positivo	39	97,5	60	75,0	99	82,5	Positivo	38	95,0	53	66,3	91	75,8	Positivo	22	55,0	0	0,0	22	18,3		
Negativo	12	30,0	39	48,8	51	42,5	Negativo	1	2,5	20	25,0	21	17,5	Negativo	2	5,0	27	33,8	29	24,2	Negativo	18	45,0	80	100,0	98	81,7		
Total	40	33,3	80	66,7	120	100,0	Total	40	33,3	80	66,7	120	100,0	Total	40	33,3	80	66,7	120	100,0	Total	40	33,3	80	66,7	120	100,0		
Kappa = 0,16 p = 0,0001						Kappa = 0,16 p < 0,0001						Kappa = 0,22 p < 0,0001						Kappa = 0,62 p < 0,0001											

Diferenças estatísticas representadas pelo valor de p (teste McNemar, IC: 95%).

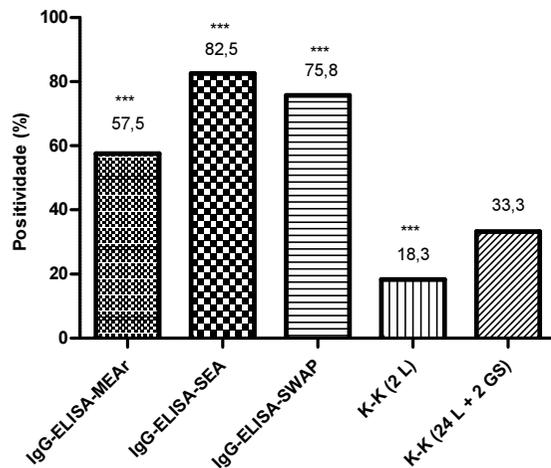


Gráfico 9: Taxa de positividade do IgG-ELISA e K-K na área de Tabuas. Valores calculados a partir da análise de 120 residentes (40 positivos e 80 negativos). Diferenças estatísticas representadas pelo *(teste McNemar, IC: 95%, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001).

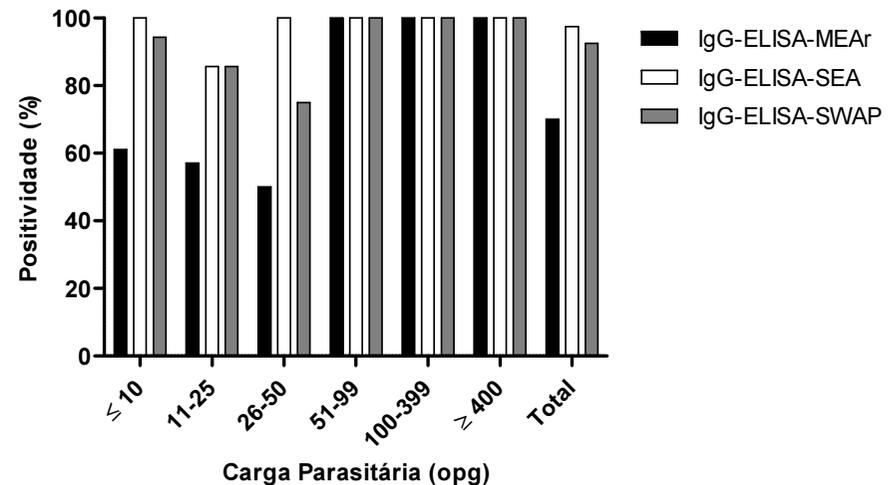


Gráfico 10: Taxa de positividade da área de Tabuas obtida de acordo com a carga parasitária (opg). Valores calculados a partir da análise dos indivíduos positivos residentes de Tabuas (n = 40).

Controle de cura dos indivíduos infectados e tratados na localidade Tabuas

Os indivíduos foram avaliados quanto à queda da DO após o tratamento com PZQ. Na avaliação da cura 180 dias após o tratamento, 22 indivíduos que foram negativos na avaliação parasitológica fizeram parte do acompanhamento. IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SEA apresentaram diferenças significativas (teste *t* pareado, $p = 0,0454$ e $p = 0,0429$) antes e após o tratamento. IgG-ELISA-SWAP não apresentou diferença significativa (teste *t* pareado, $p = 0,3947$) (Gráfico 11).

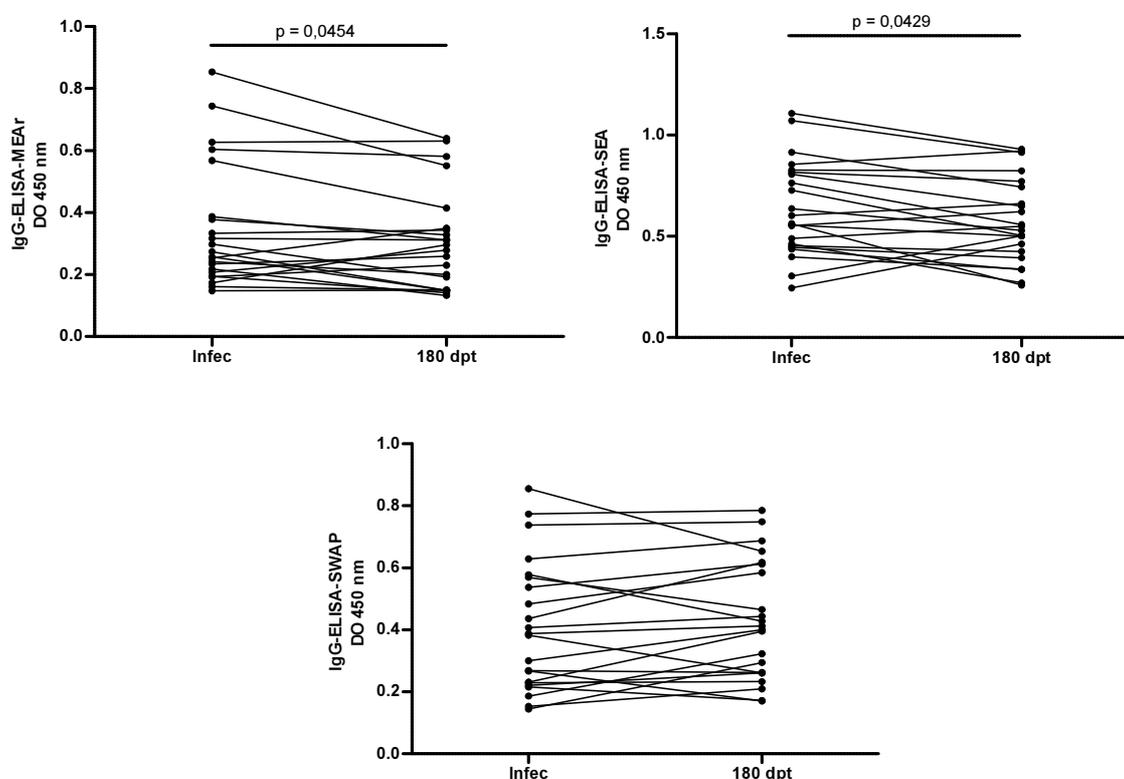


Gráfico 11: Desempenho das técnicas IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP na discriminação de indivíduos antes e após o tratamento com PZQ. Vinte e dois indivíduos foram avaliados 180 dias após o tratamento com PZQ. Os valores foram calculados a partir da média das absorvâncias antes e após o tratamento. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de *p* (teste *t* pareado, IC: 95%). DO: Densidade óptica.

O gráfico 12 apresenta o desempenho dos testes IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP na avaliação da cura após tratamento. O melhor desempenho foi de IgG-ELISA-MEAR com taxa de cura de 36,4% (8/22). IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP não foram eficientes para identificar os indivíduos tratados e curados previamente validados pelo teste de referência.

Testes	Taxa de cura	
	n	%
IgG-ELISA-MEAr	8/22	36,4
IgG-ELISA-SEA	0/22	0,0
IgG-ELISA-SWAP	0/22	0,0

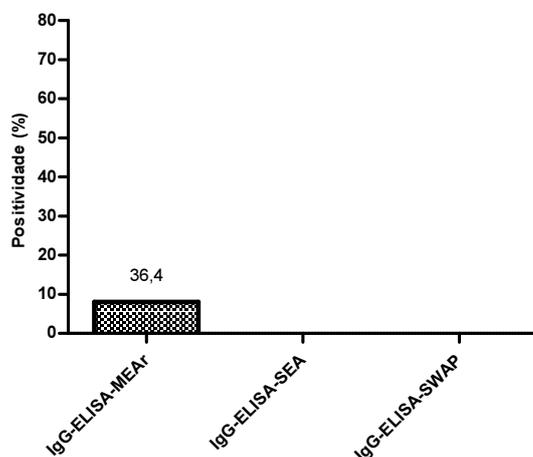


Gráfico 12: Taxa de cura obtida pelo IgG-ELISA após 180 dias de tratamento com PZQ. Os valores foram calculados a partir da análise de 22 indivíduos residentes de Tabuas curados após o tratamento.

5.6.2.2 Fase crônica: Área endêmica de Estreito de Miralta

Grupo de indivíduos positivos e negativos de área endêmica

O IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP, foram avaliados na discriminação de indivíduos positivos residentes da área endêmica de Estreito de Miralta descrita no item 4.3.1.1. Fizeram parte da avaliação amostras sorológicas de 136 residentes, 68 homens e 68 mulheres, com idade entre 2-86 anos. As 65 amostras dos indivíduos negativos saudáveis foram adicionadas como controle (item 4.3.1.3). A taxa de positividade pelo teste de referência foi 23,53% (32/136). A carga parasitária dos indivíduos foi de 1-76 opg com média geométrica de 4,8 opg e mediana 4,5 opg. A classificação dos indivíduos positivos está descrita na tabela 17. De acordo com a classificação da OMS, todos os indivíduos (100,0%) foram caracterizados com baixa intensidade de infecção na qual 78,1% eram infecções ≤ 10 opg.

Tabela 17: Classificação dos indivíduos residentes de Estreito de Miralta pela carga parasitária

Carga parasitária (opg)*	Categoria	Total	
		n	%
≤ 10		25	78,1
11-25		1	3,1
26-50		2	6,3
51-99		4	12,5
Total		32	100,0

* opg calculado a partir do método de K-K (24 lâminas = 1000 mg) e GS (2 procedimentos = 1000 mg)

Desempenho do ensaio na discriminação de indivíduos positivos e negativos de área endêmica

Assim como na área de Tabuas, os 3 testes demonstraram diferenças significativas quando o grupo positivo foi comparado com o grupo negativo de área não endêmica (Kruskal-Wallis, IC: 95%). Entretanto, a discriminação entre indivíduos positivos e aqueles negativos residentes das áreas endêmicas não foi significativa para IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SWAP ($p = 0,9223$ e $p = 0,1409$), apenas para IgG-ELISA-SEA ($p < 0,0001$) (Gráfico 13). A ASC utilizando as amostras dos indivíduos positivos e negativos da área foi 0,51, 0,74 e 0,59 para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP, respectivamente.

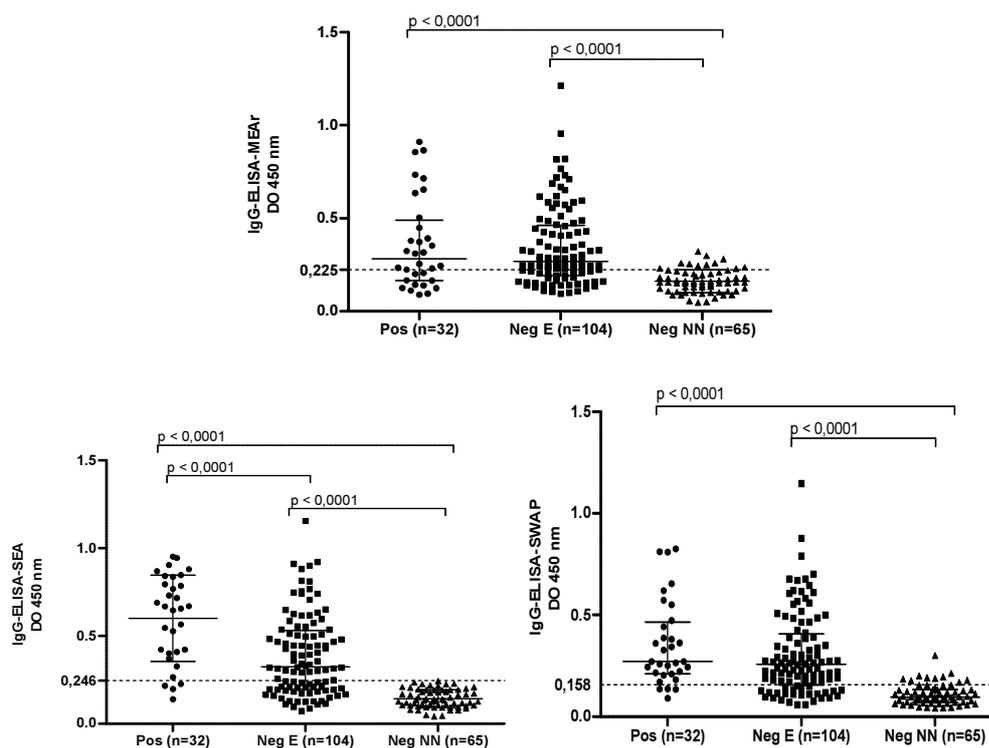


Gráfico 13: Desempenho do IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de residentes da área endêmica de Estreito de Miralta. Valores calculados a partir da média das absorvâncias de 32 indivíduos positivos (endêmicos), 104 negativos (endêmicos) e 65 negativos (não endêmicos). As linhas pontilhadas representam os PCs. As barras de erros indicam a mediana e os intervalos interquartis. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de p (Kruskal-Wallis, IC: 95%). DO: Densidade óptica. Pos: Positivos. Neg E: Negativos de área endêmica. Neg NN: Negativos de área não endêmica.

As taxas de positividade para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram 66,9%, 68,4% e 77,9%, respectivamente. A taxa de positividade do teste de K-K 24 L adotado como método de referência foi 23,5% e o K-K (2 L) foi 10,3% (Gráfico 14). A tabela 19 resume as tabelas 2 x 2 de cada teste comparado ao teste de referência. Todos os testes apresentaram diferenças significativas com o teste de referência ($p < 0,05$, McNemar, IC: 95%). IgG-ELISA-MEAR demonstrou Kappa = 0 (*poor agreement*). IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP apresentaram Kappa = 0,15 e 0,07, respectivamente (*slight agreement*).

IgG-ELISA-MEAR apresentou a menor taxa de verdadeiro positivo (65,6%, 21/32) e a maior de falso negativos (11/32). IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP demonstraram a mesma taxa de verdadeiros positivos (87,5%, 28/32), entretanto IgG-ELISA-SEA foi superior com uma maior taxa de verdadeiros negativos (37,5%, 39/104). IgG-ELISA-SWAP alcançou a maior taxa de falso positivos (75%, 78/104).

A tabela 18 apresenta a taxa de positividade por grupos de cargas. Todos os indivíduos de Estreito de Miralta (100%) foram caracterizados com baixa intensidade de infecção (< 100 opg) dos quais 72% representavam o grupo com carga ≤ 10 opg. Nenhum dos

testes identificou 100% dos indivíduos no grupo ≤ 10 opg, entretanto IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP demonstraram melhor desempenho (22/25) em relação a IgG-ELISA-MEAR (18/25) nesse grupo e nos demais. IgG-ELISA-SWAP foi o único teste que conseguiu identificar 100% dos indivíduos do grupo 11/25 e IgG-ELISA-SEA o único para o grupo 26-50. Na análise geral, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP demonstraram maior taxa de positividade entre os indivíduos que foram positivos no teste parasitológico alcançando 87,5% (28/32) (Gráfico 15).

Tabela 18: Taxa de positividade de Estreito de acordo com a carga parasitária pelo método de referência

Carga parasitária (opg)*	≤ 10		11-25		26-50		51-99		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IgG-ELISA-MEAR	18/25	72,0	0/1	0,0	1/2	50,0	2/4	50,0	21/32	65,6
IgG-ELISA-SEA	22/25	88,0	0/1	0,0	2/2	100,0	4/4	100,0	28/32	87,5
IgG-ELISA-SWAP	22/25	88,0	1/1	100,0	1/2	50,0	4/4	100,0	28/32	87,5

* opg calculado a partir do método de K-K (24 lâminas = 1000 mg) e GS (2 procedimentos = 1000 mg)

Tabela 19: Avaliação de desempenho do IgG-ELISA e K-K (2 L) na discriminação de indivíduos positivos (n = 32) e negativos (n = 104) para *S. mansoni* residentes de Estreito de Miralta

		Método de referência (K-K 24 L + 2 GS)													
		Positivo				Negativo				Total					
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
IgG-ELISA-MEAR	Positivo	21	65,6	70	67,3	91	66,9	IgG-ELISA-SEA	Positivo	28	87,5	65	62,5	93	68,4
	Negativo	11	34,4	34	32,7	45	33,1		Negativo	4	12,5	39	37,5	43	31,6
	Total	32	23,5	104	76,5	136	100,0		Total	32	23,5	104	76,5	136	100,0
	Kappa = 0 p < 0,0001						Kappa = 0,15 p < 0,0001								
IgG-ELISA-SWAP	Positivo	28	87,5	78	75,0	106	77,9	K-K (2 L)	Positivo	14	43,8	0	0,0	14	10,3
	Negativo	4	12,5	26	25,0	30	22,1		Negativo	18	56,3	104	100,0	122	89,7
	Total	32	23,5	104	76,5	136	100,0		Total	32	23,5	104	76,5	136	100,0
	Kappa = 0,07 p < 0,0001						Kappa = 0,54 p < 0,0001								

Diferenças estatísticas representadas pelo valor de p (teste McNemar, IC: 95%).

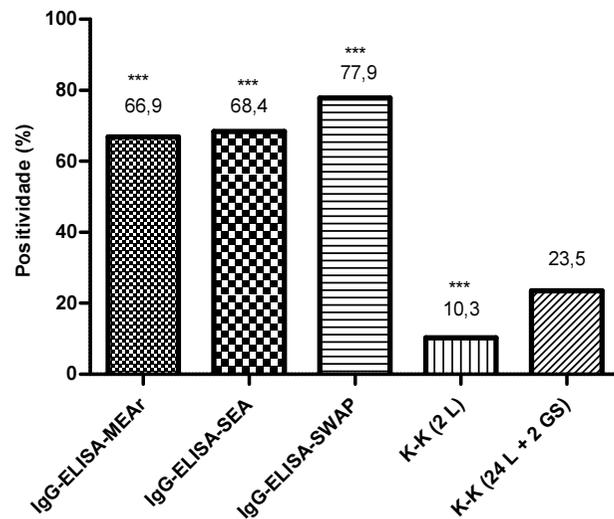


Gráfico 14: Taxa de positividade do IgG-ELISA e K-K na área de Estreito de Miralta. Valores calculados a partir da análise de 136 residentes (32 positivos e 104 negativos). Diferenças estatísticas representadas pelo *(teste McNemar, IC: 95%, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001).

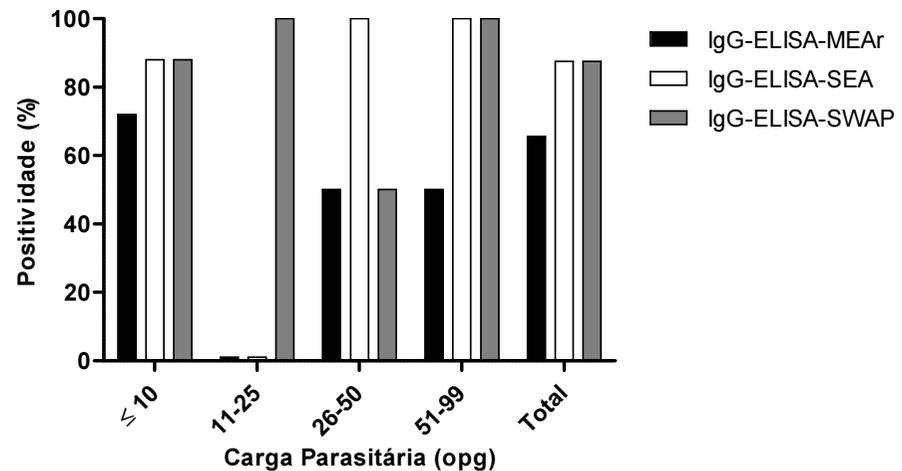


Gráfico 15: Taxa de positividade da área de Tabuas obtida de acordo com a carga parasitária (opg). Valores calculados a partir da análise dos indivíduos positivos residentes de Estreito de Miralta (n = 32).

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

Na avaliação da cura 180 dias após o tratamento, 22 indivíduos que foram negativos na avaliação parasitológica fizeram parte do acompanhamento em Estreito de Miralta. IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SEA apresentaram diferenças significativas (teste *t* pareado, $p \leq 0,05$) antes e após o tratamento. IgG-ELISA-SWAP não apresentou diferença significativa (teste *t* pareado, $p = 0,1116$) (Gráfico 16).

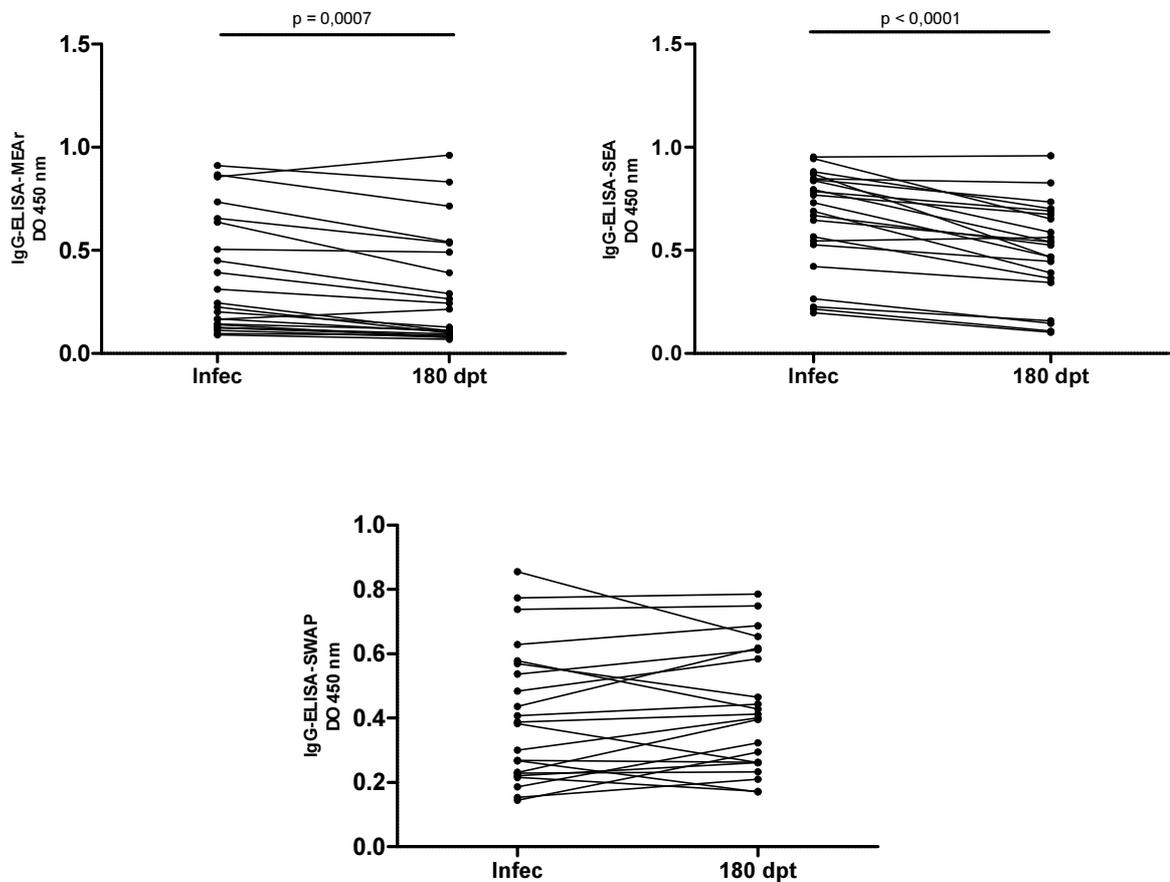


Gráfico 16: Desempenho das técnicas IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP na discriminação de indivíduos antes e após o tratamento com PZQ. Vinte e dois indivíduos foram avaliados 180 dias após o tratamento com PZQ. Os valores foram calculados a partir da média das absorbâncias antes e após o tratamento. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de *p* (teste *t* pareado, IC: 95%). DO: Densidade óptica.

O gráfico 17 apresenta a taxa de cura dos testes IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP. O melhor desempenho foi de IgG-ELISA-MEAR com taxa de cura de 54,54% (12/22).

Testes	Taxa de cura	
	n	%
IgG-ELISA-MEAR	12/22	54,5
IgG-ELISA-SEA	4/22	18,2
IgG-ELISA-SWAP	6/22	27,3

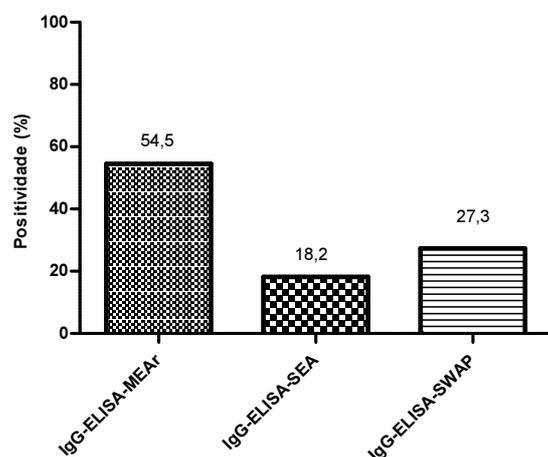


Gráfico 17: Taxa de cura obtida pelo IgG-ELISA após 180 dias de tratamento com PZQ. Os valores foram calculados a partir da análise de 22 indivíduos residentes de Estreito de Miralta curados após o tratamento.

5.6.2.3 Negativos residentes em área sem transmissão localizada próxima a área endêmicas: Samambaia

A localidade rural de Samambaia está localizada na região endêmica de Montes Claros. A área rural possui as mesmas características das áreas endêmicas de Tabuas e Estreito de Miralta. Entretanto nenhum caso de esquistossomose e outras helmintoses foram detectados na área após uma extensa avaliação parasitológica (K-K 24 L e 2 GS). O estudo relacionado a essa área e obtenção das amostras está descrito no item 4.3.1.4. Fizeram parte dessa avaliação 166 residentes, 93 homens e 73 mulheres entre 2-84 anos de idade. Amostras dos indivíduos saudáveis não residentes de área endêmica foram analisadas em paralelo para avaliar a amplitude de discriminação entre os grupos (Gráfico 18). O único caso positivo (K-K = 8 opg) não refletiu a prevalência no local uma vez que o indivíduo residia há pouco tempo na comunidade. A taxa de positividade para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram respectivamente 95,8%, 81,9% e 91%. Todos os testes identificaram mais que 80% de todos os indivíduos negativos da área, apresentando um baixo desempenho (Gráfico 19).

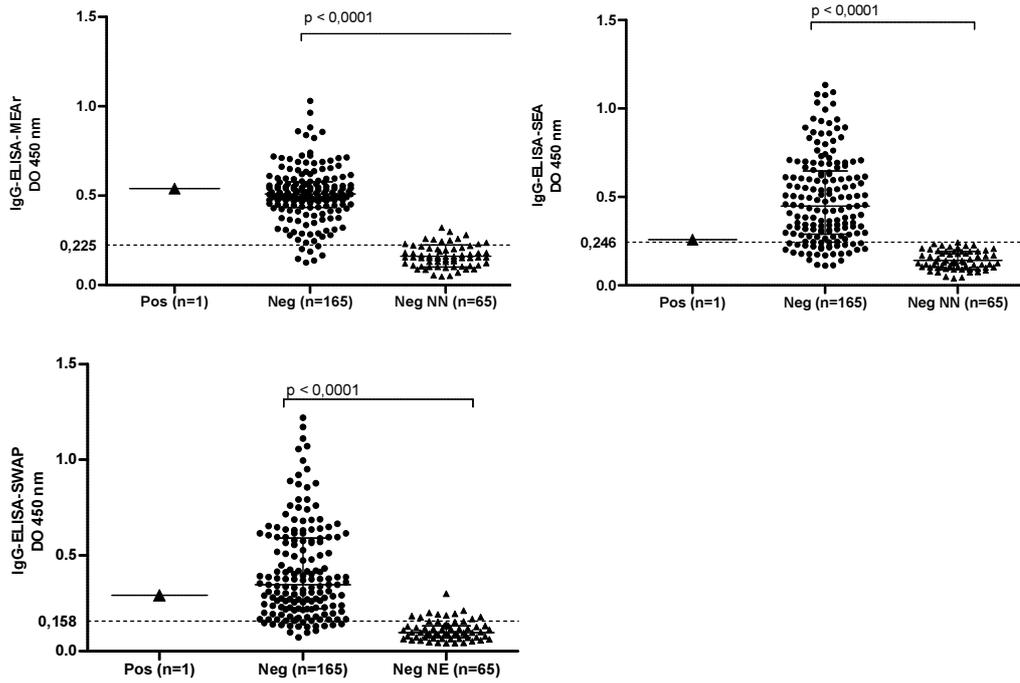


Gráfico 18: Desempenho do IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de indivíduos negativos residentes em área sem transmissão próximos a áreas endêmicas. Valores calculados a partir da média das absorvâncias de 1 indivíduo positivo, 165 negativos da área e 65 negativos (não endêmicos). As linhas pontilhadas representam os PCs. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de p (teste Mann-Whitney, IC 95%). DO: Densidade óptica. Pos: Positivos. Neg: Negativos da área. Neg NN: Negativos de área não endêmica.

Testes	Samambaia	
	n	%
IgG-ELISA-MEAR	159/166	95,8
IgG-ELISA-SEA	136/166	81,9
IgG-ELISA-SWAP	151/166	91,0

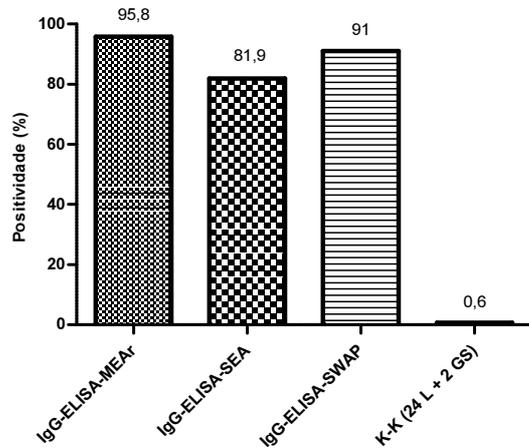


Gráfico 19: Taxa de positividade de indivíduos residentes da área de Samambaia. Os valores foram calculados a partir da análise de 166 indivíduos residentes da área (1 positivo e 165 negativos).

5.6.2.5 Fase aguda: Turistas infectados em São Joao Del Rei

Amostras sorológicas de 49 indivíduos em fase aguda foram avaliadas. A descrição da obtenção dessas amostras está descrita no item 4.3.1.2. O teste parasitológico de fezes não foi realizado em todos os indivíduos, sendo, portanto a maioria deles diagnosticados por sinais e sintomas clínicos comuns a fase aguda de infecção. Amostras de indivíduos saudáveis negativos não residentes de área endêmica e submetidos a áreas de risco para infecção (item 4.3.1.3) foram analisadas em paralelo para demonstrar a amplitude da discriminação entre positivos e negativos (Gráfico 20). A taxa de positividade para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram respectivamente 89,8%, 100% e 91,8% (Gráfico 21).

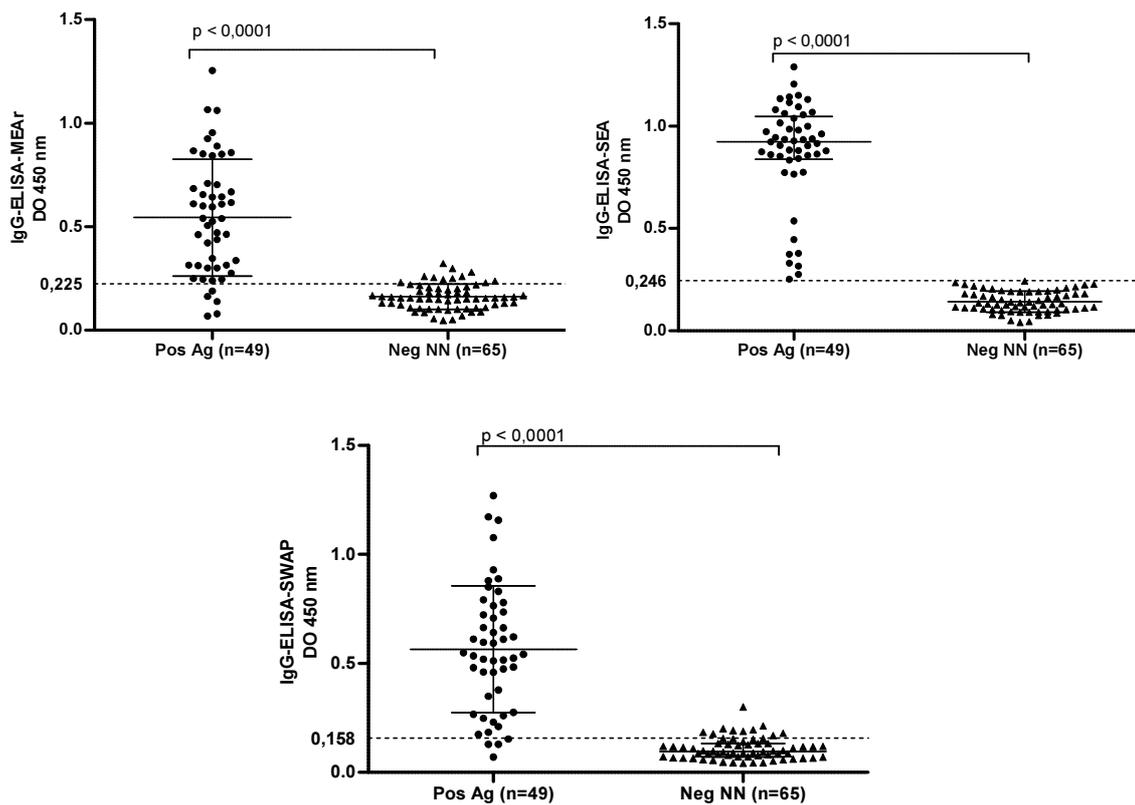


Gráfico 20: Desempenho do IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP no diagnóstico de indivíduos em fase aguda da infecção. Valores calculados a partir da média das absorbâncias de 49 indivíduos positivos e 65 negativos (não endêmicos). As linhas pontilhadas representam os PCs. As barras de erros indicam a mediana e os intervalos interquartis. Diferenças estatísticas estão representadas pelo valor de p (teste Mann-Whitney, IC 95%). DO: Densidade óptica. Pos Ag: Positivos em fase aguda de infecção. Neg NN: Negativos de área não endêmica.

Testes	Fase aguda	
	n	%
IgG-ELISA-MEAr	44/49	89,8
IgG-ELISA-SEA	49/49	100
IgG-ELISA-SWAP	45/49	91,8

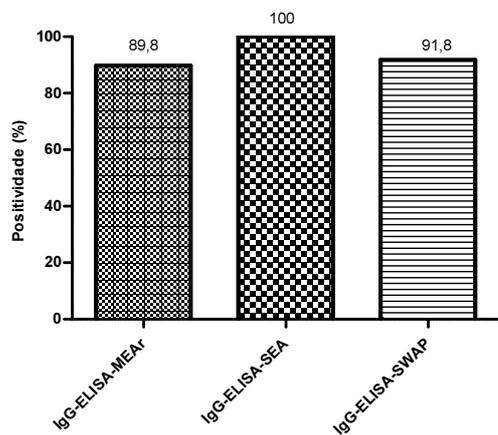


Gráfico 21: Taxa de positividade de turistas de São Joao Del Rei. Os valores foram calculados a partir da análise de 49 indivíduos turistas da região (49 positivos).

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico da esquistossomose necessita de avanços na atualidade. Os programas de controle ao longo dos anos, envolvendo o melhoramento do saneamento básico e disponibilidade do PZQ, resultaram no controle da morbidade e conseqüentemente no aumento de áreas de baixa endemicidade. A técnica oficialmente padronizada pela OMS, o K-K realizado com 2 lâminas, possui baixa sensibilidade nessas áreas as quais correspondem a grande parte das regiões afetadas atualmente (WHO/PAHO, 2014; Katz, 2018). O POC-CCA® tem sido avaliado como uma possível ferramenta para ser integrada aos programas de controle da doença. Na África, POC-CCA® tem sido apontado como método superior ao K-K no mapeamento da prevalência e determinação das estratégias de controle (Colley *et al.*, 2017). No Brasil, o desempenho do POC-CCA® ainda apresenta baixo desempenho com um grande número de resultados falsos devido à interpretação de traços como positivos, quando na verdade muitos deles são negativos (Coelho *et al.*, 2016; Grenfell *et al.*, 2018). Além disso, existe também um número significativo de resultados falso negativos devido a baixa sensibilidade na identificação de indivíduos com baixas cargas parasitárias (Silveira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018). O Brasil e as regiões endêmicas da África possuem perfis epidemiológicos diferentes. Estudos prévios demonstraram que as baixas intensidades de infecção no Brasil são caracterizadas, na sua grande maioria, por cargas < 25 opg (Siqueira *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018).

Visando a disponibilidade de mais alternativas de diagnóstico, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de um novo antígeno recombinante produzido a partir do ovo de *S. mansoni* no imunodiagnóstico da esquistossomose. A detecção de anticorpos tem aumentado a sensibilidade na identificação de indivíduos de áreas não endêmicas, geralmente infectados durante viagens a áreas de transmissão (Van Gool *et al.*, 2002; El Aswad Bel *et al.*, 2011; Hinz *et al.*, 2017; Infurnari *et al.*, 2017). Esses casos são raramente diagnosticados pelas técnicas parasitológicas devido à ausência de ovos nas fezes. Lambertucci e colaboradores (2013) empregaram o IgG-ELISA-SWAP como um critério no tratamento de turistas infectados após a exposição a um, até então, desconhecido foco de transmissão. Esses indivíduos não haviam entrado em contato com nenhuma área endêmica anteriormente ou recebido tratamento no passado. Todos os 50 viajantes apresentaram sintomas semelhantes da fase aguda com altos títulos de IgG anti-*Schistosoma* (Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013; Lambertucci *et al.*, 2013). O IgG-ELISA-SEA é um método

comercialmente disponível utilizado na detecção de profissionais de saúde recém chegados de áreas endêmicas (Kinkel *et al.*, 2012).

Embora indivíduos de área endêmica sejam expostos o tempo todo a antígenos do parasito, possuindo, portanto, altos títulos de anticorpos sem estarem infectados, estudos prévios apontaram o uso das técnicas indiretas como ferramenta auxiliar na identificação de indivíduos com baixas cargas parasitárias residentes dessas áreas (Kanamura *et al.*, 1998; Noya *et al.*, 2002; Igreja *et al.*, 2007; Da Frota *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012; Espirito-Santo *et al.*, 2014). Pinheiro e colaboradores (2012) realizaram a triagem de indivíduos de uma área de baixa endemicidade do Brasil através da detecção de anticorpos. Os indivíduos positivos na sorologia foram conduzidos a uma extensa avaliação parasitológica (K-K, Helmintex e GS) adotada como referência do estudo (Pinheiro *et al.*, 2012). Espirito-Santo e colaboradores (2015) recomendaram o IgG e IgM-ELISA como ferramenta de triagem seguidos da análise por um método mais específico (PCR) na detecção de casos em uma área de baixa endemicidade no Brasil, elaborando assim um algoritmo capaz de estimar a real positividade da área (Espirito-Santo *et al.*, 2015).

A detecção de antígenos ou anticorpos aderidos a tiras imonocromatográficas, disponíveis em cassetes no formato *point-of-care*, são os mais incentivados pelo setor público devido a sua facilidade operacional em áreas com baixos recursos (Smith *et al.*, 2012; Corstjens *et al.*, 2014; Hinz *et al.*, 2017). Durante o desenvolvimento dessas tecnologias, são necessários investimentos a longo prazo, envolvendo desde a pesquisa básica até a aplicação dos testes nas áreas afetadas (Mabey *et al.*, 2004). A escolha de um marcador apropriado (antígeno) e a avaliação do desempenho em técnicas convencionais como o ELISA estão entre os passos principais da fase inicial de desenvolvimento de um RDT (Corstjens *et al.*, 2014; Utzinger *et al.*, 2015). Neste trabalho o potencial do antígeno recombinante MEAr foi avaliado na técnica de ELISA indireta, baseada na identificação de anticorpos (IgG) em amostras sorológicas de indivíduos positivos e negativos de diferentes perfis epidemiológicos (área endêmica e não endêmica). Uma vez comprovado o potencial do antígeno, este poderá ser direcionado para a produção de anticorpos monoclonais e composição de um método direto adaptado para um RDT. As técnicas diretas são mais visionadas, uma vez que se aproximam mais da especificidade associada aos testes parasitológicos (Cavalcanti *et al.*, 2013).

A escolha do antígeno é fundamental para a sensibilidade e especificidade atribuída aos imunoensaios. O uso de ferramentas proteômicas é uma das alternativas aplicadas durante a busca por novos antígenos marcadores de diagnóstico e prognóstico, assim como candidatos

para produção de vacina contra doenças infecciosas (Mutapi *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2014; Ludolf *et al.*, 2014). A combinação de análises proteômicas e sorológicas é denominada imunoproteômica, a qual consiste basicamente em três etapas: separação do extrato proteico por eletroforese bidimensional; detecção dos *spots* imunogênicos ao soro por *Western blotting*; e identificação das proteínas imunogênicas por espectrometria de massas (Ducan & Hunsucker, 2005). No presente estudo, por meio de experimentos de *Western blotting* bidimensional, procuramos explorar o imunoproteoma do extrato solúvel do ovo de *S. mansoni* empregando diferentes grupos de amostras com o intuito de identificar um candidato promissor ao diagnóstico em qualquer condição da infecção, como fase aguda e crônica, e também a diferenciação da fase pós-tratamento e as infecções casadas por outros helmintos.

Alguns estudos de imunoproteômica envolvendo o fracionamento dos extratos de *Schistosoma sp.* já foram realizados na busca de biomarcadores de infecção. Mutapi e colaboradores (2005) avaliaram a imunorreatividade do soro de indivíduos infectados com *S. haematobium* contra antígeno de verme adulto identificando 26 proteínas imunodominantes (Mutapi *et al.*, 2005). Zhong e colaboradores (2010) realizaram a triagem de antígenos de verme adulto de *S. japonicum* utilizando soro de coelho infectado com a finalidade do uso no imunodiagnóstico da doença. A partir desse estudo foram produzidos dois antígenos recombinantes (*leucine aminopeptidase e fructose bisphosphate aldolase*) os quais apresentaram sensibilidade acima de 90% para detecção de indivíduos em fase aguda e acima de 80% para indivíduos em fase crônica, além de especificidade 96,7% para ambos no ELISA indireto (Zhong *et al.*, 2010). No que diz respeito a *S. mansoni*, dois estudos utilizaram a abordagem imunoproteômica com resultados promissores na busca por candidatos vacinais (Losada *et al.*, 2011; Ludolf *et al.*, 2014). Losada e colaboradores (2011) utilizando soro de coelho imunizado com dois peptídeos sintéticos de Sm28GST avaliaram o reconhecimento dos mesmos em extratos brutos de cercária e verme adulto sugerindo a elaboração de uma vacina eficaz contra diferentes estágios do parasito (Losada *et al.*, 2011). Ludolf e colaboradores (2014) identificaram 47 proteínas imunorreativas ao extrato bruto de verme adulto utilizando uma triagem com soros de indivíduos positivos de áreas endêmicas. Soros de indivíduos negativos de área endêmica resistentes a infecção foram também testados e um antígeno foi unicamente reconhecido nesse grupo, o Fator Eucariótico de Elongamento da Tradução, sendo indicado como um potencial candidato vacinal (Ludolf *et al.*, 2014).

A abordagem do presente trabalho é a primeira realizada com extrato solúvel de ovo de *S. mansoni* utilizando um painel de soros humanos heterogêneo, principalmente no que diz respeito às amostras de indivíduos infectados com outros helmintos, de fase aguda e após

tratamento com PZQ. Essa diversidade de amostras permitiu uma triagem mais racional de um novo candidato ao diagnóstico. A fim de determinar se a imunorreatividade dos soros era proveniente de epítomos proteicos ou glicídicos, foi realizada uma etapa adicional do tratamento do SEA imobilizado em membrana de PVDF com metaperiodato/borohidreto. A oxidação com periodato é empregada para determinar a participação da porção glicídica na reatividade imunológica de glicoproteínas (Woodward *et al.*, 1985). A presença de epítomos proteicos fortalece a produção da forma recombinante em sistema heterólogo de bactéria com manutenção da antigenicidade. Essa etapa também contribuiu para excluir da avaliação os *spots* reconhecidos com o grupo de amostras de indivíduos infectados com outros helmintos. O uso do SEA bruto leva a um número significativo de reações cruzadas devido ao poliparasitismo comum em áreas endêmicas (Doenhoff *et al.*, 2004). Geralmente, as glicanas, responsáveis pela hipersensibilidade dos granulomas, são as frações mais compartilhadas e as mais imunogênicas entre as espécies (Ashton *et al.*, 2001; Mathieson e Wilson, 2010; Meevissen *et al.*, 2010).

Vinte e três *spots* foram imunorreativos para as amostras positivas para *S. mansoni* (fase aguda e crônica). Destes, 22 foram compartilhados com soros de pacientes infectados com outros helmintos. O perfil de reconhecimento dos antígenos pelo *pool* de soro de indivíduos infectados por *S. mansoni* nas membranas tratadas pelo periodato/borohidreto reduziu em 50% comparado as membranas não tratadas (23 para 12 *spots*). O mesmo aconteceu com a reatividade do soro dos pacientes infectados com outros helmintos (22 para 11 *spots*). A reatividade do *pool* de amostras negativas não mostrou diferença após oxidação (10 para 10 *spots*). Alguns estudos indicaram que a resposta imune de seres humanos infectados por parasitos pode ser diretamente contra epítomos de carboidratos e de glicoconjugados (Curwen *et al.*, 2004; Meevissen *et al.*, 2010). Embora, nem todos os carboidratos são sensíveis ao tratamento com periodato (Woodward *et al.*, 1985), esses dados sugerem a influência das porções glicídicas na imunogenicidade das glicoproteínas e também sua participação nas reações cruzadas com outros parasitos. Alarcón de Noya e colaboradores (2000) demonstraram que a manipulação do SEA através da modificação das glicanas aumentou a especificidade do teste de IgG-ELISA na detecção de indivíduos infectados com *S. mansoni* (Alarcon De Noya *et al.*, 2000). As glicoproteínas foram identificadas e excluídas durante a seleção do antígeno candidato ao imunodiagnóstico.

O presente trabalho identificou igualmente 23 *spots* na fase aguda e na fase crônica na qual resultaram na caracterização de 12 proteínas imunogênicas. Atualmente, a diferenciação entre as duas fases de infecção se baseia em dados clínicos e epidemiológicos. Diferenciá-las

por meio do diagnóstico sorológico poderia contribuir para o estabelecimento de condutas adequadas para o tratamento dos pacientes infectados, entretanto este trabalho não identificou nenhuma proteína diferencialmente expressa para qualquer uma das fases de infecção. Alguns estudos inicialmente apontaram alguns antígenos como SmRP26 e KHL com potencial para discriminar entre a fase aguda e crônica, entretanto não houve reprodutibilidade nas avaliações posteriores (Verweij *et al.*, 1995; Makarova *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2005; Tanigawa *et al.*, 2015). Um estudo mais sofisticado utilizando microarranjo de proteínas avaliou o reconhecimento de 92 proteínas utilizando soros de indivíduos infectados (fase aguda e crônica) e não infectados de área não endêmica. Cinquenta antígenos foram reconhecidos por soros em fase aguda e crônica. Desses, 8 antígenos mostraram diferença entre positivos e negativos, e 4 foram diferencialmente reconhecidos entre fase aguda e fase crônica (*Peptidyl prolyl cis trans isomerase B*, *Solute carrier family 31*, *Hypothetical protein*, *Gamma aminobutyric acid receptor subunit*) (De Assis *et al.*, 2016). Esses antígenos podem, potencialmente, ser avaliados na padronização e validação de novos métodos diferenciais para o diagnóstico das fases de infecção.

Anticorpos ficam presentes no soro mesmo depois do tratamento do indivíduo, tornando-se um problema na diferenciação de infecções atuais em relação às curadas (Doenhoff *et al.*, 2004). A persistência de anticorpos após o tratamento prejudica o monitoramento pós-tratamento o qual poderia ser solucionado por meio de um diagnóstico diferencial, utilizando um antígeno específico para essa fase. Na análise imunoproteômica após 180 dias do tratamento, os mesmos antígenos antes do tratamento foram identificados após o tratamento, havendo apenas uma discreta diminuição da intensidade da reação. Mutapi e colaboradores (2005), empregando uma abordagem similar a este trabalho, porém com infecções com *S. haematobium*, identificaram 5 proteínas exclusivamente imunorreativas em amostras sorológicas após o tratamento. Uma justificativa para a presença de novos antígenos nessa fase está relacionada à liberação desses antígenos após a morte do parasito e exposição para o sistema imunológico do hospedeiro (Mutapi *et al.*, 2005).

Dentre as proteínas identificadas na análise imunoproteômica, a *Major Egg Antigen*, denominada aqui como MEA, foi a única que atendeu aos critérios propostos e demonstrou potencial para compor um teste de diagnóstico: foi identificada nas amostras de indivíduos infectados para *S. mansoni* (agudos e crônicos); não foi reconhecida no grupo de indivíduos infectados por outros helmintos e no grupo de indivíduos negativos; e manteve a imunorreatividade após deglicosilação do extrato. MEA, conhecida também como Smp-40, é uma das 40 proteínas mais expressas do SEA (Curwen *et al.*, 2004; Mathieson e Wilson,

2010). Curwen e colaboradores (2004), comparando o proteoma de *S. mansoni* entre os estágios do ciclo de vida, descreveram a proteína MEA como uma das 40 proteínas mais expressas no extrato solúvel de ovo (em torno de 10%) (Curwen *et al.*, 2004). Cass e colaboradores (2007) demonstraram que MEA é a terceira proteína mais abundante secretada pelo ovo (Cass *et al.*, 2007). van Balkom e colaboradores (2005) em sua análise proteômica demonstraram que MEA pode ser encontrada também no tegumento de vermes adultos (Van Balkom *et al.*, 2005).

MEA é uma chaperona e tem homologia para a família das proteínas de choque térmico. As chaperonas são as proteínas mais abundantes do ovo e estão envolvidas na proteção do miracídio ao estresse oxidativo do meio, a desnaturação e agregação de proteínas (Mathieson e Wilson, 2010). Esse tipo de proteína, em parasitos, age como antígenos imunodominantes desencadeando uma acentuada resposta T e B, principalmente na produção de citocinas do tipo Th1 (Cai *et al.*, 1996). MEA foi descrita como altamente antigênica em seres humanos infectados (Cao *et al.*, 1993). O perfil de citocinas obtidos de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados por *S. mansoni* e estimuladas com MEA purificada foi associado à redução da formação do granuloma e a uma vacina anti-patológica (Abouel-Nour *et al.*, 2006).

Essa proteína foi previamente sugerida para ser empregada no imunodiagnóstico uma vez que foi imunoprecipitada no soro humano (Nene *et al.*, 1986) e em soro de camundongo na fase crônica infecção (Cordingley *et al.*, 1983). Nene e colaboradores (1986) empregando soro anti-Smp40 recombinante produzido em coelho, demonstraram o reconhecimento do antígeno em diferentes estágios de vida do parasito: cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos (Nene *et al.*, 1986). Cass e colaboradores (2007) utilizando a reação periovular demonstraram pontos da secreção de MEA na superfície do ovo através da precipitação antígeno-anticorpo por fluorescência (Cass *et al.*, 2007). Ludolf e colaboradores (2014) identificaram a imunorreatividade desse antígeno contra amostras de indivíduos crônicos através do WB-2D (Ludolf *et al.*, 2014). A proteína recombinante MEAr foi produzida mantendo demonstrou reconhecimento similar a forma nativa. MEAr foi reconhecida pelo soro de indivíduo infectado de área endêmica (106 opg) e não foi reconhecida pelo soro de indivíduo negativo de área não endêmica. Ludolf e colaboradores (2014) apresentaram resultado similar com o dado adicional da não reatividade de indivíduos negativos resistentes à infecção moradores de áreas endêmicas (Ludolf *et al.*, 2014).

A relação de MEA com o imunodiagnóstico ainda é escassa na literatura. Uma vez que esse antígeno se mostrou promissor na triagem imunoproteômica, avaliamos o desempenho da

forma recombinante (MEAr) na detecção de IgG por ELISA. Embora a detecção de anticorpos possua baixo desempenho na diferenciação de infecções ativas daquelas curadas, sua principal vantagem está na detecção de indivíduos recentemente expostos a áreas de risco (fase pré-patente) e aqueles com baixas cargas parasitárias (Da Frota *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012; Cavalcanti *et al.*, 2013; Espirito-Santo *et al.*, 2015). Além disso, o uso de antígenos recombinantes aliado ao ELISA, pode potencialmente aumentar a especificidade do teste, atribuindo mais valor na sua aplicação (Grenfell, Silva-Moraes, *et al.*, 2012; Cavalcanti *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014; Kalenda *et al.*, 2015).

As amostras positivas utilizadas na técnica do IgG-ELISA-MEAR foram validadas por uma extensa avaliação parasitológica. Como 93,5% (n = 87) dos indivíduos do grupo possuíam cargas abaixo de 10 opg, um aperfeiçoamento da detecção parasitológica é necessário para garantir a real taxa de positividade (Enk, Lima, *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2015). Isso possibilitou ter um método de referência para a determinação dos índices de desempenho das técnicas de IgG-ELISA. A taxa de positividade pelo método de K-K (2 L) foi de 22,8% e pelo método de referência foi 58,9%. A comparação entre as duas técnicas apresentou um Kappa = 0,34 (*fair agreement*). O K-K (2 L) diagnosticou apenas 36 casos dos 93 casos detectados pelo teste de referência, confirmando sua baixa eficiência para indivíduos com infecções de baixa intensidade. Siqueira e colaboradores (2015, 2016) apresentaram dados similares em duas áreas de baixa endemicidade do Brasil quando a taxa de positividade aumentou de 8% para 14,4% e de 10,6% para 19,1% analisando 2 L e 24 L, respectivamente (Siqueira *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016).

A alta sensibilidade da técnica de IgG-ELISA permite identificar indivíduos comumente não diagnosticados pela técnica padronizada pela OMS (K-K 2L/1A) (Da Frota *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012; Espirito-Santo *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2014; Kalenda *et al.*, 2015). Além da avaliação do desempenho do IgG-ELISA-MEAR tendo como referência a avaliação parasitológica, o IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP também foram incluídos na análise. Esses métodos já foram descritos e são utilizados no Centro Nacional de Referência para Diagnóstico da Esquistossomose da Fiocruz na determinação do diagnóstico em casos com sintomas persistentes da doença, porém com teste parasitológico negativo (Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013). Mesmo tendo essas técnicas disponíveis, o uso de antígenos brutos apresenta limitações. É necessário ter uma infraestrutura adequada para manutenção do ciclo biológico do *S. mansoni* e uma grande quantidade de animais para desenvolver a fase de desenvolvimento relacionada ao hospedeiro definitivo para obtenção de vermes e ovos. A possibilidade da produção em larga escala de

antígenos recombinantes tem ampliado seu uso como alternativa aos antígenos brutos (El Aswad Bel *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Hinz *et al.*, 2017).

Para a padronização dos 3 ensaios, IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP, foram empregadas amostras de indivíduos das áreas endêmicas de Pedra Preta, Tabuas e Estreito de Miralta, totalizando o grupo com 93 amostras. As amostras de indivíduos de área não endêmica não tinham histórico de infecção por *S. mansoni* nem haviam entrado em contato com áreas endêmicas nos últimos 10 anos. Todos os 3 antígenos demonstraram desempenho satisfatório na discriminação dos indivíduos positivos e negativos ($ASC > 0,90$). A ASC é uma medida de precisão diagnóstica global na qual o valor 1 indica teste perfeito e 0,5 não discriminante (Borges, 2016). O ensaio IgG-ELISA-SWAP apresentou o melhor desempenho com ASC igual a 0,96 entretanto sem diferença significativa com IgG-ELISA-MEAR. Sarhan e colaboradores (2014), utilizando o mesmo padrão de amostras deste trabalho demonstraram resultados similares com ASC igual a 0,992 e 0,871 para IgG-ELISA-SWAP e IgG-ELISA-SEA, respectivamente (Sarhan *et al.*, 2014). Grenfell e colaboradores (2013) determinaram $ASC = 0,9402$ na discriminação de indivíduos positivos de área endêmica e indivíduos saudáveis de área não endêmica empregando o CCAR no IgG-ELISA, corroborando com o desempenho satisfatório do uso de antígenos recombinantes nesta análise (Grenfell, R., Harn, D. A., *et al.*, 2013).

As taxas de positividade para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram 57,6%, 48,1% e 62% com Kappa igual a 0,71, 0,79 e 0,80 (*substantial agreement*), respectivamente. Embora a concordância de IgG-ELISA-MEAR não tenha sido superior aos testes empregando os antígenos brutos, todos apresentaram o mesmo grau de concordância com o método referência. Prévios estudos identificaram Kappa igual a 0,85 e 0,75 para IgG-ELISA-SWAP e IgG-ELISA-SEA em relação ao K-K (24 L) (Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013). A concordância entre IgG-ELISA-MEAR e as técnicas IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram determinadas considerando que essas são metodologias já padronizadas. O índice Kappa foi 0,57 para IgG-ELISA-MEAR *versus* IgG-ELISA-SEA e 0,60 para IgG-ELISA-MEAR *versus* IgG-ELISA-SWAP (*moderate agreement*). Na comparação das absorbâncias obtidas no IgG-ELISA, SWAP também se relacionou melhor com MEAR ($r^2 = 0,73$) em relação ao SEA ($r^2 = 0,51$). Kalenda e colaboradores (2015) avaliaram a relação das absorbâncias do IgG-ELISA empregando SEA e SWAP em relação ao antígeno recombinante SmTRP8 e obtiveram r^2 igual a 0,68 e 0,89, respectivamente, corroborando com os dados apresentados neste trabalho (Kalenda *et al.*, 2015). Smith e colaboradores (2012) demonstraram um coeficiente $r^2 = 0,91$ na relação entre

SEA e o antígeno de cercária CTF no IgG-ELISA (Smith *et al.*, 2012). Esses dados mostram que antígenos recombinantes, embora não superem os antígenos brutos, apresentam relação positiva significativa.

A sensibilidade e especificidade denominam-se também taxa de verdadeiros positivos e taxa de verdadeiros negativos, respectivamente, e são utilizados na avaliação do desempenho de testes diagnósticos (Obuchowski *et al.*, 2004). O teste ideal, com 100% de sensibilidade e especificidade raramente existe na prática, pois a tentativa de melhorar a sensibilidade frequentemente tem o efeito de diminuir a especificidade. Uma maior sensibilidade conduz a um menor número de falso negativos e seria uma alternativa recomendada na escolha do PC quando se deseja que nenhum indivíduo fique sem tratamento e contribua para transmissão da doença. Entretanto a taxa de verdadeiros negativos (especificidade) nessas condições é menor, conduzindo a um grande número de falso positivos e de tratamentos desnecessários. Os PCs neste trabalho foram selecionados baseados no índice de acurácia e apresentaram diferentes combinações de sensibilidade e especificidade. A acurácia por definição é a proporção de indivíduos classificados corretamente entre todas as amostras analisadas, ou seja, um teste com 100% de acurácia tem 100% de sensibilidade e especificidade (Crowther, 2001; Borges, 2016). A acurácia para IgG-ELISA-MEAR, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foi 86,08%, 89,24% e 90,51%, respectivamente. Seguindo esse critério de seleção, IgG-ELISA-MEAR alcançou sensibilidade de 87,10% (81/93) e especificidade de 84,62% (55/65); IgG-ELISA-SEA 81,72% (76/93) e 100% (65/65) e IgG-ELISA-SWAP 94,62% (88/93) e 84,62 (55/65).

O teste que apresentou maior sensibilidade foi IgG-ELISA-SWAP (87,10%) e o teste que demonstrou maior especificidade foi IgG-ELISA-SEA (100%). Sarhan e colaboradores (2014), empregando amostras de área não endêmica como controle negativo na avaliação de três antígenos brutos, atribuíram maior sensibilidade para IgG-ELISA-SWAP (100%) e maior especificidade para IgG-ELISA-SEA (82,35%). Os autores deste trabalho adotaram como critério o *cut-off* com maior sensibilidade e a mínima especificidade com o objetivo de obter menos resultados falso negativos (Sarhan *et al.*, 2014). Se a mesma sensibilidade fosse selecionada para todos os testes, por exemplo, 89,25%, IgG-ELISA-MEAR seria mais específico que IgG-ELISA-SEA com um maior número de resultados verdadeiros negativos. El Aswad e colaboradores (2011) demonstraram resultados similares com o antígeno recombinante CTF comparado ao SEA em amostras de uma área não endêmica. Com a mesma sensibilidade (89,7%) CTF alcançou especificidade superior ao SEA (100% vs 95,2%) (El Aswad Bel *et al.*, 2011). Outros estudos relacionaram altos níveis de sensibilidade e

especificidade aos antígenos recombinantes rSm200 (90% vs 93,3%) (Carvalho *et al.*, 2014) e CCAr utilizando amostras positivas de área endêmica e negativas de área não endêmica como controle (100% vs 96%) (Grenfell, R., Harn, D. A., *et al.*, 2013).

IgG-ELISA-SEA apresentou 100% de especificidade, identificando todos os indivíduos negativos como tal. Entretanto essa alta especificidade estimou 17 casos falso negativos. Se fosse considerar essa metodologia estabelecida no diagnóstico como é demonstrado fora do Brasil (Kinkel *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012), 17 indivíduos ficariam sem receber o tratamento adequado e contribuiriam para a transmissão da doença. Os ensaios IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SWAP apresentaram a mesma especificidade, com 10 resultados falso positivos, os quais receberiam o tratamento indevidamente. IgG-ELISA-SWAP apresentou a menor taxa de falso negativos (5/93) entre todos os testes de modo que 5 indivíduos ficariam sem o tratamento enquanto que esse número aumentaria para 12 se IgG-ELISA-MEAR fosse empregado. Embora a taxa de falso positivos seja significativa nas aplicações de SEA e SWAP, Silveira e colaboradores (2016) demonstraram que IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP eficientemente diagnosticaram 14,6% dos indivíduos que não foram diagnosticados por POC-CCA mas que posteriormente foram confirmados por K-K (Silveira *et al.*, 2016)

Indivíduos com cargas ≤ 10 opg corresponderam a 68,8% (64/93) do total de amostras testadas. Este grupo representa grande maioria das infecções encontradas nas áreas de transmissão da doença no Brasil (Siqueira *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018). Dentre as 64 amostras, 56 foram identificadas por IgG-ELISA-MEAR e 27 representavam cargas igual a 1 opg. Entre as 8 amostras não identificadas, 2 possuíam cargas com 1 opg. O ensaio IgG-ELISA-SEA identificou apenas 49 amostras desse grupo o que pode ser justificado pela escolha do PC com uma menor sensibilidade. Entre as 15 amostras não identificadas pelo IgG-ELISA-SEA, 10 possuíam cargas com 1 opg. Já IgG-ELISA-SWAP mostrou o melhor desempenho, identificando 59 casos com cargas ≤ 10 opg. Entre os 5 casos não identificados, 4 possuíam cargas de 1 opg e 1 possuía carga de 2 opg. A maioria dos indivíduos não identificados por IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP possuíam cargas abaixo de 25 opg e 10 opg, respectivamente. Por outro lado, as 12 amostras não identificadas entre os 93 indivíduos positivos pelo IgG-ELISA-MEAR possuíam cargas parasitárias variando de 1 a 99 opg.

O coeficiente de relação encontrado entre as variáveis absorbância e opg foi baixo em todos os ensaios, principalmente para IgG-ELISA-MEAR ($r^2 = 0,02$), o que justifica a não identificação de indivíduo com carga de 52 opg. Outros trabalhos também demonstraram a

ausência de relação entre os títulos de anticorpos e a carga parasitária quando SEA, SWAP e outros antígenos recombinantes foram utilizados no IgG-ELISA (Sorgho *et al.*, 2005; Grenfell, R. F., Martins, W., Enk, M., *et al.*, 2013; Kalenda *et al.*, 2015). Por outro lado, uma correlação positiva significativa foi demonstrada pelo IgG-ELISA utilizando o antígeno recombinante rSm200 (Carvalho *et al.*, 2014), CEF6 (Dunne *et al.*, 1984; Doenhoff *et al.*, 1993) e SERPIN (Tanigawa *et al.*, 2015). A falta de correlação entre os títulos de anticorpos e a carga parasitária ainda é um problema na padronização de novos métodos, uma vez que a intensidade de infecção ainda é determinada pela contagem de ovos nas fezes.

Uma vez que a técnica IgG-ELISA-MEAR foi padronizada, esta foi avaliada em grupos de estudos distintos: duas áreas endêmicas com pacientes possuindo baixas cargas parasitárias (Tabuas e Estreito de Miralta), um grupo de amostras de indivíduos acometidos pela fase aguda em uma viagem de turismo (São João Del Rei), e um grupo de indivíduos negativos de uma área sem transmissão para esquistossomose, porém localizada em uma região endêmica (Samambaia).

Nas áreas endêmicas de Tabuas e Estreito de Miralta as taxas de positividade foram 33,3% e 23,5%, empregando o método de referência, respectivamente. A discriminação entre indivíduos positivos e negativos residentes destas áreas apresentou diferença significativa apenas para IgG-ELISA-SEA com ASC igual a 0,70 e 0,74 para Tabuas e Estreito de Miralta, respectivamente. Outros estudos não demonstraram o mesmo (Smith *et al.*, 2012). IgG-ELISA-MEAR e IgG-ELISA-SWAP demonstraram desempenho aproximados em Tabuas (ASC = 0,57 vs 0,56) e Estreito de Miralta (ASC = 0,51 vs 0,59), confirmando a relação entre os ensaios apresentada na padronização. IgG-ELISA-SEA foi o método mais sensível em Tabuas (97,5%) e conseqüentemente o menos específico (25%). IgG-ELISA-MEAR foi o mais específico (48,8%) entretanto o menos sensível (70%). IgG-ELISA-SWAP apresentou sensibilidade próxima ao IgG-ELISA-SEA (95%) com especificidade superior (33,8%). Na área de Estreito de Miralta, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP apresentaram a mesma sensibilidade (87,5%), porém IgG-ELISA-SEA determinou maior especificidade (37,5%).

Quaisquer uns dos antígenos brutos demonstraram melhor desempenho nas áreas endêmicas em relação ao antígeno recombinante. Os testes IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram os mais sensíveis, entretanto a taxa de falsos positivos foi maior que 50%. Novamente, se o IgG-ELISA fosse empregado como uma ferramenta isolada, 60 indivíduos identificados falsamente como positivos pelo IgG-ELISA-SEA receberiam o tratamento indevidamente. Já em Estreito, seriam 78 indivíduos negativos tratados desnecessariamente. Bezerra e colaboradores (2018) demonstraram uma alta taxa de positividade do IgG-ELISA-

SWAP (40,7%) em relação ao teste parasitológico (1,6%), provavelmente devido a resultados falso positivos (Bezerra *et al.*, 2018). Enquanto que por um lado, IgG-ELISA-MEAr poderia evitar esses resultados falso positivos, o número de falso negativos em Tabuas (12/40) e Estreito de Miralta (11/32) foram os mais altos. Essa interpretação levaria ao não tratamento desses indivíduos, fazendo que os mesmos continuassem contribuindo para a transmissão da doença.

A queda da especificidade quando os testes indiretos são aplicados nas áreas endêmicas assim como o baixo desempenho da diferenciação entre os indivíduos positivos e negativos residentes de áreas endêmicas já foram reportados (Sorgho *et al.*, 2005; El Aswad Bel *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Dawson *et al.*, 2013). El Aswad e colaboradores (2011) demonstraram a queda da especificidade quando o IgG-ELISA empregando SEA e o antígeno recombinante CTF foram primariamente empregado em uma área não endêmica e posteriormente avaliados em indivíduos positivos e negativos endêmicos. A queda da especificidade foi maior para o antígeno SEA (95,2% vs 26,3%) em relação ao antígeno recombinante CTF (100 vs 68,4%), corroborando com nossos resultados (El Aswad Bel *et al.*, 2011). Esses dados já haviam sido reportados anteriormente associados ao antígeno CEF6 (Doenhoff *et al.*, 1993). Dawson e colaboradores demonstraram 76,6% de sensibilidade e 37,9% de especificidade pelo IgG-ELISA-SEA na identificação de crianças de uma área endêmica (Dawson *et al.*, 2013).

A análise após 180 dias do tratamento também foi realizada nessas áreas. Houve queda significativa do título de anticorpos para IgG-ELISA-SEA entretanto não o suficiente para ser considerado negativo no ELISA, ou seja, estar abaixo do PC. Além da existência de anticorpos por longos períodos após o tratamento, a persistência de determinados antígenos no organismo do hospedeiro é capaz de estimular a produção e manter os níveis reativos (Mutapi *et al.*, 2005). Trabalhos demonstram que níveis de IgG1, IgG3 e principalmente IgG4 anti-SEA e SWAP caem 6 meses após tratamento e que a determinação de títulos de IgG4 pode ser um bom indicador da cura após tratamento (Vendrame *et al.*, 2001). Neste trabalho anticorpos anti-SWAP não demonstraram queda após o tratamento. IgG-ELISA-MEAr foi o mais eficiente entre os 3 ensaios o qual determinou uma taxa de cura de 36,4% para Tabuas e 54,4% para Estreito de Miralta. IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP não identificaram nenhum indivíduo tratado e curado em Tabuas (0/22). Alguns antígenos são reportados na literatura como eficientes marcadores da cura após tratamento, como SmTRP10 (Kalenda *et al.*, 2015), CEF 6 (Bligh *et al.*, 2010) e CCA (Grenfell, R., Harn, D. A., *et al.*, 2013). Um teste preliminar foi realizado com amostras de área endêmica positivas exclusivamente para outros

helminthos (n = 37), e a taxa de positividade de IgG-ELISA-MEAr foi menor (54,1%) em relação a SEA (70,3%) e SWAP (73,0%).

Um dado mais interessante está relacionado ao resultado da área de Samambaia e chama atenção para o uso de ensaios indiretos em áreas de indivíduos constantemente expostos em regiões endêmicas. Samambaia apresenta condições socioeconômicas e sanitárias semelhante a Tabuas e Estreito de Miralta, bem caracterizadas como áreas endêmicas do município de Montes Claros. Entretanto a técnica de K-K e GS identificaram 0,6% de positividade o qual representa 1 caso importado de outra localidade. As taxas de positividade para IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP foram 95,8%, 81,9% e 91%. Algumas amostras desse grupo compuseram o *pool* (15 amostras) da análise imunoproteômica e não reagiram com a proteína nativa. Embora a análise por espectrometria de massas tenha identificado 90% de cobertura do MEAr, essa proteína está reagindo com mais de 80% dos indivíduos sabidamente negativos. Esse resultado deve ser investigado com maior profundidade uma vez que essa área não possui transmissão para *S. mansoni*.

O grupo de indivíduos de fase aguda foi previamente estudado em dois trabalhos nos quais a detecção de anticorpos contra SWAP e SmTeg atribui grande valor da detecção desses indivíduos precocemente (Lambertucci, 2010; Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013). Grenfell e colaboradores (2013) demonstraram taxa de positividade de 80% no IgG-ELISA-SmTeg em relação ao IgG-ELISA-SWAP na análise desse grupo (Grenfell, R. F., Martins, W., Drummond, S. C., *et al.*, 2013). Entre os 49 indivíduos positivos, apenas 24 haviam doado fezes para realização do teste de K-K (4 L). IgG-ELISA-MEAr, IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP identificaram 44, 49 e 45 indivíduos como positivos, respectivamente. Os 24 pacientes positivos para K-K foram identificados pelas três técnicas. Em geral, os antígenos secretados pelo ovo são considerados um dos mais imunogênicos, desencadeando uma resposta exacerbada na fase inicial da infecção (Wilson *et al.*, 2007; Mathieson e Wilson, 2010). Isso pode explicar uma resposta mais acentuada contra SEA na fase aguda e conseqüentemente 100% de sensibilidade na identificação desse grupo. Prévios estudos utilizaram a detecção de IgA contra SEA e obtiveram uma resposta superior na detecção da fase aguda em relação a fase crônica (Rabello, 1995; Valli *et al.*, 1997).

7 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou com sucesso a produção e a aplicação de um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da esquistossomose. Mesmo com o bom desempenho de antígenos brutos nos métodos imunológicos, deve se considerar a disponibilidade de produção em larga escala dos antígenos recombinantes, difícil de ser alcançada pelos antígenos brutos devido à infraestrutura necessária para manutenção do ciclo biológico de *S. mansoni*. MEA foi identificada a partir do primeiro estudo de imunoproteômica utilizando extrato de ovo e amostras sorológicas humanas. Essa proteína foi reconhecida especificamente pelas amostras positivas para *S. mansoni* na análise 2D e sua forma recombinante (MEAr) manteve sua antigenicidade em ensaios de WB com soro positivo (área endêmica) e negativo (controle). Na discriminação de indivíduos positivos de área endêmica e negativos de área não endêmica utilizados como controle, IgG-ELISA-MEAR determinou uma ASC = 0,94 sem diferença significativa com IgG-ELISA-SEA (ASC = 0,94) e IgG-ELISA-SWAP (ASC = 0,96). Com uma sensibilidade de 87,10% e especificidade de 84,62%, o teste foi capaz de identificar 87,5% (56/64) indivíduos com cargas ≤ 10 opg dos quais 27 apresentavam 1 opg. Na discriminação de indivíduos positivos e negativos residentes de áreas endêmicas IgG-ELISA-MEAR apresentou baixa especificidade ($< 50\%$) assim como IgG-ELISA-SEA e IgG-ELISA-SWAP. Entretanto foi capaz de identificar indivíduos com baixas cargas parasitárias não identificados pelo método padronizado (K-K 2 laminas).

Embora IgG-ELISA-MEAR tenha demonstrado resultados significantes na detecção de indivíduos com baixa carga parasitária, os métodos baseados na detecção de ovos continuam sendo a primeira escolha devido a alta especificidade. Enquanto que por um lado a detecção de anticorpos anti-MEAR por ELISA não pode ser aplicado como um único teste, o mesmo pode servir na elaboração de algoritmo para determinação da real prevalência em áreas de transmissão. Uma vez que o IgG-ELISA tem uma menor frequência de resultados falsos negativos, o mesmo pode ser aplicado como uma ferramenta de triagem seguido por uma subsequente avaliação parasitológica robusta. Na ausência de um método altamente sensível, o uso de combinadas técnicas se torna relevante em áreas de baixa endemicidade quando a eliminação da doença é um objetivo declarado. Finalmente, os dados apresentados neste trabalho poderão contribuir para o aperfeiçoamento de estratégias adotadas no controle da esquistossomose assim como abrir perspectivas para o desenvolvimento de técnicas que envolvam a detecção direta de MEAr através da produção de anticorpos monoclonais e detecção do antígeno em amostras não invasivas como saliva e urina.

REFERÊNCIAS

ABOUEL-NOUR, M. F. et al. Schistosoma mansoni major egg antigen Smp40: molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 365-72, Jun 2006. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951805> >.

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**, v. 136, p. 50-7, Aug 2014. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727052> >.

AGNEW, A. et al. The relationship between worm burden and levels of a circulating antigen (CAA) of five species of Schistosoma in mice. **Parasitology**, v. 111 (Pt 1), p. 67-76, Jul 1995. ISSN 0031-1820 (Print)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7609992> >.

ALARCON DE NOYA, B. et al. Schistosoma mansoni: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. **Exp Parasitol**, v. 95, n. 2, p. 106-12, Jun 2000. ISSN 0014-4894 (Print)

0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910711> >.

ALSALLAQ, R. A. et al. Quantitative assessment of the impact of partially protective anti-schistosomiasis vaccines. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 4, p. e0005544, Apr 2017. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28410369> >.

ASHTON, P. D. et al. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, v. 122, n. Pt 3, p. 329-38, Mar 2001. ISSN 0031-1820 (Print)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289069> >.

BARDA, B. et al. Mini-FLOTAC and Kato-Katz: helminth eggs watching on the shore of Lake Victoria. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 1, p. 220, Jul 31 2013. ISSN 1756-3305 (Electronic)

1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902918> >.

BARDA, B. D. et al. Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2344, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23936577> >.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **J Adv Res**, v. 4, n. 5, p. 433-44, Sep 2013. ISSN 2090-1232 (Print)

2090-1224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685450> >.

BECK, L. et al. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 229-33, Nov-Dec 2008. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18851939> >.

BECK, L. et al. Evaluation of tests based on the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 97-8, 2004. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486643> >.

BERGQUIST, R.; JOHANSEN, M. V.; UTZINGER, J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? **Trends Parasitol**, v. 25, n. 4, p. 151-6, Apr 2009. ISSN 1471-4922 (Print)

1471-4922 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269899> >.

BEZERRA, F. S. M. et al. Evaluating a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen test (POC-CCA) to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic area in north-eastern Brazil. **Acta Trop**, Mar 8 2018. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29526480> >.

BINA, J. C.; PRATA, A. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-*Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 2, p. 211-6, Mar-Apr 2003. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806456> >.

BLAGG, W. et al. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. **Am J Trop Med Hyg**, v. 4, n. 1, p. 23-8, Jan 1955. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13228845> >.

BLIGH, J. et al. Serological analysis of the outcome of treatment of *Schistosoma mansoni* infections with praziquantel. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 104, n. 6, p. 511-20, Sep 2010. ISSN 1364-8594 (Electronic)

0003-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863440> >.

BORGES, L. S. R. Medidas de Acurácia Diagnóstica na Pesquisa Cardiovascular. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 29, n. 3, p. 218-222, 2016.

BOUKLI, N. M. et al. Fasciola hepatica and Schistosoma mansoni: identification of common proteins by comparative proteomic analysis. **J Parasitol**, v. 97, n. 5, p. 852-61, Oct 2011. ISSN 1937-2345 (Electronic)

0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21506812> >.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 4, p. 163-76, Apr 2009. ISSN 1365-3024 (Electronic)

0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19292768> >.

CAI, Y. et al. A cloned major Schistosoma mansoni egg antigen with homologies to small heat shock proteins elicits Th1 responsiveness. **Infect Immun**, v. 64, n. 5, p. 1750-5, May 1996. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613387> >.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 109-17, Nov-Dec 2008. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18577364> >.

CANDIDO, R. R. F. et al. Evaluation of the immunogenicity of Schistosoma mansoni egg surface. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 652-657, Sep-Oct 2017. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160512> >.

CAO, M.; CHAO, H.; DOUGHTY, B. L. Cloning of a cDNA encoding an egg antigen homologue from Schistosoma mansoni. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, n. 1, p. 169-71, Mar 1993. ISSN 0166-6851 (Print)

0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8459829> >.

CARNEIRO, T. R. et al. Increased detection of schistosomiasis with Kato-Katz and SWAP-IgG-ELISA in a Northeastern Brazil low-intensity transmission area. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 4, p. 510-3, Jul-Aug 2012. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930048> >.

CARVALHO, G. B. et al. Evaluation of the use of C-terminal part of the Schistosoma mansoni 200kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. **Exp Parasitol**, v. 139, p. 24-32, Apr 2014. ISSN 1090-2449 (Electronic)

0014-4894 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560833> >.

CARVALHO, G. B. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 837-43, Nov 2011. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124556> >.

CARVALHO, G. B. F. et al. Selecting targets for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection: An integrative approach using multi-omic and immunoinformatics data. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182299, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28817585> >.

CASS, C. L. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Mol Biochem Parasitol**, v. 155, n. 2, p. 84-93, Oct 2007. ISSN 0166-6851 (Print)

0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644200> >.

CAVALCANTI, M. G. et al. Schistosomiasis in áreas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 2, p. 75-82, Feb 2013. ISSN 1471-5007 (Electronic)

1471-4922 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290589> >.

CESARI, I. M. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission áreas. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 2, p. 280-6, Feb 2005. ISSN 1071-412X (Print)

1071-412X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699423> >.

CHAND, M. A.; CHIODINI, P. L.; DOENHOFF, M. J. Development of a new assay for the diagnosis of schistosomiasis, using cercarial antigens. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 4, p. 255-8, Apr 2010. ISSN 1878-3503 (Electronic)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096907> >.

COELHO, P.; CALDEIRA, R. L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. **Infect Dis Poverty**, v. 5, n. 1, p. 57, Jul 4 2016. ISSN 2049-9957 (Electronic)

2049-9957 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27374126> >.

COELHO, P. M.; ENK, M. J.; KATZ, N. Treatment of clinical schistosomiasis at the prepatent phase: an option? **Trends Parasitol**, v. 25, n. 7, p. 299-300, Jul 2009. ISSN 1471-5007 (Electronic)

1471-4922 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19539529> >.

COELHO, P. M. et al. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 720-3, Aug 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820832> >.

COELHO, P. 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**, v. 10, n. 6, p. e0004778, Jun 2016. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27326453> >.

COLLEY, D. G. Morbidity control of schistosomiasis by mass drug administration: how can we do it best and what will it take to move on to elimination? **Trop Med Health**, v. 42, n. 2 Suppl, p. 25-32, Jun 2014. ISSN 1348-8945 (Print)

1348-8945 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425948> >.

COLLEY, D. G.; ANDROS, T. S.; CAMPBELL, C. H., JR. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 63, Mar 22 2017. ISSN 2049-9957 (Electronic)

2049-9957 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28327187> >.

COLLEY, D. G. et al. A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 3, p. 426-32, Mar 2013. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339198> >.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 347-57, Aug 2014. ISSN 1365-3024 (Electronic)

0141-9838 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142505> >.

CORDINGLEY, J. S. et al. Clone banks of cDNA from the parasite *Schistosoma mansoni*: isolation of clones containing a potentially immunodiagnostic antigen gene. **Gene**, v. 26, n. 1, p. 25-39, Dec 1983. ISSN 0378-1119 (Print)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6323252> >.

CORSTJENS, P. et al. Utilizing the ultrasensitive *Schistosoma* up-converting phosphor lateral flow circulating anodic antigen (UCP-LF CAA) assay for sample pooling-strategies. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 155, Nov 01 2017. ISSN 2049-9957 (Electronic)

2049-9957 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29089064> >.

CORSTJENS, P. L. et al. Tools for diagnosis, monitoring and screening of *Schistosoma* infections utilizing lateral-flow based assays and upconverting phosphor labels. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1841-55, Dec 2014. ISSN 1469-8161 (Electronic)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932595> >.

CORSTJENS, P. L. et al. Improved sensitivity of the urine CAA lateral-flow assay for diagnosing active *Schistosoma* infections by using larger sample volumes. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 241, Apr 22 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic)

1756-3305 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25896512> >.

CORSTJENS, P. L. et al. Up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen in serum. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 171-6, Jan 2008. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942645> >.

COSENZA, M. et al. IgM and IgG responses in *Schistosoma mansoni*-infected mice using egg and worm antigens: Does response vary with parasitic burden and phase of infection? **Exp Parasitol**, v. 179, p. 36-42, Aug 2017. ISSN 1090-2449 (Electronic)

0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28655585> >.

COULIBALY, J. T. et al. Accuracy of urine circulating cathodic antigen (CCA) test for *Schistosoma mansoni* diagnosis in different settings of Cote d'Ivoire. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 11, p. e1384, Nov 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132246> >.

COULIBALY, J. T. et al. Comparison of sensitivity and faecal egg counts of Mini-FLOTAC using fixed stool samples and Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. **Acta Trop**, v. 164, p. 107-116, Dec 2016. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27591137> >.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic áreas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 13-9, 2004. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486629> >.

CROWTHER, J. R. Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases. In: PRESS, H. (Ed.). **The ELISA guidebook** v.149, 2001. p.301-305. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-0-89603-950-6.

CURWEN, R. S. et al. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. **Mol Biochem Parasitol**, v. 138, n. 1, p. 57-66, Nov 2004. ISSN 0166-6851 (Print)

0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500916> >.

DA FROTA, S. M. et al. Combination of Kato-Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. **Acta Trop**, v. 120 Suppl 1, p. S138-41, Sep 2011. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522322> >.

DAWSON, E. M. et al. Intestinal schistosomiasis in pre school-aged children of Lake Albert, Uganda: diagnostic accuracy of a rapid test for detection of anti-schistosome antibodies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 107, n. 10, p. 639-47, Oct 2013. ISSN 1878-3503 (Electronic)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23976783> >.

DE ASSIS, R. R. et al. A next-generation proteome array for *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol**, v. 46, n. 7, p. 411-5, Jun 2016. ISSN 1879-0135 (Electronic)

0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27131510> >.

DE JONGE, N. et al. Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 84, n. 6, p. 815-8, Nov-Dec 1990. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128984> >.

DE OLIVEIRA, E. J. et al. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 4, p. 360-6, Apr 2008. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314149> >.

DE VLAS, S. J. et al. A model for variations in single and repeated egg counts in *Schistosoma mansoni* infections. **Parasitology**, v. 104 (Pt 3), p. 451-60, Jun 1992. ISSN 0031-1820 (Print)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1641245> >.

DEELDER, A. M. et al. Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Trop Geogr Med**, v. 46, n. 4 Spec No, p. 233-8, 1994. ISSN 0041-3232 (Print)

0041-3232 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7825226> >.

DOENHOFF, M. J. et al. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 1, p. 42-8, Jan-Feb 1993. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8465393> >.

DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends Parasitol**, v. 20, n. 1, p. 35-9, Jan 2004. ISSN 1471-4922 (Print)

1471-4922 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14700588> >.

DOENHOFF, M. J. et al. The detection of antibodies against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens (SEA) and CEF6 in ELISA, before and after chemotherapy. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 97, n. 7, p. 697-709, Oct 2003. ISSN 0003-4983 (Print)

0003-4983 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613629> >.

DUNNE, D. W. et al. The stage-, strain- and species-specificity of a *Schistosoma mansoni* egg antigen fraction (CEF6) with serodiagnostic potential. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 78, n. 4, p. 460-70, 1984. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6541379> >.

EL ASWAD BEL, D. et al. Use of recombinant calreticulin and cercarial transformation fluid (CTF) in the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni*. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 379-85, Mar 2011. ISSN 1878-3279 (Electronic)

0171-2985 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691496> >.

ENK, M. J. et al. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 537-40, Jul 2010. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721505> >.

ENK, M. J.; KATZ, N.; ZECH COELHO, P. M. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 2, p. 112-5, Feb 2008. ISSN 1743-4386 (Electronic)

1743-4378 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18253140> >.

ENK, M. J. et al. Factors related to transmission of and infection with *Schistosoma mansoni* in a village in the South-eastern Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 570-7, Jul 2010. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721510> >.

ENK, M. J. et al. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 222-8, Nov-Dec 2008. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973744> >.

ENK, M. J.; OLIVEIRA E SILVA, G.; RODRIGUES, N. B. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38947, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701733> >.

ESPIRITO-SANTO, M. C. et al. Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni in Áreas of Low Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 135689, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504777> >.

ESPIRITO-SANTO, M. C. et al. Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 12, p. 2275-84, Dec 2014. ISSN 1435-4373 (Electronic)

0934-9723 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25030291> >.

FAGUNDES TEIXEIRA, C. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 2, p. e73, Nov 14 2007. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18060086> >.

FAVRE, T. C. Directives for Schistosomiasis Control in Endemic Áreas of Brazil. 2012. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/directives-for-schistosomiasis-control-in-endemic-areas-of-brazil> >. Acesso em: 11/24.

FAVRE, T. C. et al. School-based and community-based actions for scaling-up diagnosis and treatment of schistosomiasis toward its elimination in an endemic area of Brazil. **Acta Trop**, v. 149, p. 155-62, Sep 2015. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940353> >.

FENWICK, A.; ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V. Implementation of human schistosomiasis control: Challenges and prospects. **Adv Parasitol**, v. 61, p. 567-622, 2006. ISSN 0065-308X (Print)

0065-308X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735173> >.

FERRARI, T. C.; MOREIRA, P. R. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 9, p. 853-64, Sep 2011. ISSN 1474-4465 (Electronic)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849166> >.

FERREIRA, F. T. et al. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen rapid urine test in the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection and evaluation of morbidity

in a low- endemic área in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 3, p. 358-364, May-Jun 2017. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28700054> >.

GANDASEGUI, J. et al. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission área of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 3, p. e0006314, Mar 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29534072> >.

GBD. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1151-1210, Sep 16 2017. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28919116> >.

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, p. e664, Apr 20 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421918> >.

GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 3-11, Jan-Feb 2014. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553804> >.

GONCALVES, M. M. et al. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. **Acta Trop**, v. 100, n. 1-2, p. 24-30, Nov 2006. ISSN 0001-706X (Print)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17069742> >.

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**, v. 7, n. 2, p. e2054, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469295> >.

GRENFELL, R. et al. The schistosomula tegument antigen as a potential candidate for the early serological diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 75-8, Mar-Apr 2013. ISSN 1678-9946 (Electronic)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563758> >.

GRENFELL, R. F. et al. Newly established monoclonal antibody diagnostic assays for *Schistosoma mansoni* direct detection in areas of low endemicity. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87777, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498191> >.

GRENFELL, R. F. et al. Acute schistosomiasis diagnosis: a new tool for the diagnosis of schistosomiasis in a group of travelers recently infected in a new focus of *Schistosoma mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 2, p. 208-13, Mar-Apr 2013. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23740077> >.

GRENFELL, R. F. et al. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, May 2013. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778663> >.

GRENFELL, R. F. et al. Antigens of worms and eggs showed a differentiated detection of specific IgG according to the time of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 4, p. 505-9, Jul-Aug 2012. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930047> >.

GRENFELL, R. F. et al. Immunodiagnostic methods: what is their role in areas of low endemicity? **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 593947, 2012. ISSN 1537-744X (Electronic)

1537-744X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319886> >.

GRENFELL, R. F. Q. et al. Innovative methodology for point-of-care circulating cathodic antigen with rapid urine concentration 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**, Mar 7 2018. ISSN 1878-3503 (Electronic) 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29522211> >.

HAAS, W. et al. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **J Parasitol**, v. 83, n. 6, p. 1079-85, Dec 1997. ISSN 0022-3395 (Print)

0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406783> >.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Front Immunol**, v. 4, p. 89, 2013. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596444> >.

HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Res**, v. 10, n. 11, p. 1788-95, Nov 2000. ISSN 1088-9051 (Print)

1088-9051 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076863> >.

HINZ, R. et al. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. **Mol Cell Probes**, v. 31, p. 2-21, Feb 2017. ISSN 1096-1194 (Electronic)

0890-8508 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27986555> >.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **J Public Health Puerto Rico**, v. 9, p. 283-291, 1934. Disponível em:

< <http://libraria.rcm.upr.edu:8080/jspui/bitstream/2010/809/1/The%20Sedimentation%20Concentration.pdf> >.

HU, D. D. et al. Identification of early diagnostic antigens from *Spirometra erinaceieuropaei* sparganum soluble proteins using immunoproteomics. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 45, n. 3, p. 576-83, May 2014. ISSN 0125-1562 (Print)

0125-1562 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974641> >.

HUSSEIN, H. M. et al. Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum. **Parasitol Res**, v. 111, n. 1, p. 475-8, Jul 2012. ISSN 1432-1955 (Electronic)

0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290447> >.

IGREJA, R. P. et al. Schistosoma mansoni-related morbidity in a low-prevalence area of Brazil: a comparison between egg excretors and seropositive non-excretors. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 101, n. 7, p. 575-84, Oct 2007. ISSN 0003-4983 (Print)

0003-4983 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17877876> >.

INFURNARI, L. et al. The use of circulating cathodic antigen rapid test and serology for diagnosis of active *Schistosoma mansoni* infection in migrants in Italy, a non-endemic country: a cross sectional study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 452-455, Jun 2017. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28591406> >.

INVITROGEN. **A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems**. MAN0000282 (250522) 2003.

JENKINS-HOLICK, D. S.; KAUL, T. L. Schistosomiasis. **Urol Nurs**, v. 33, n. 4, p. 163-70, Jul-Aug 2013. ISSN 1053-816X (Print)

1053-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24079113> >.

KALENDA, Y. D. et al. Tandem repeat recombinant proteins as potential antigens for the sero-diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol Int**, v. 64, n. 6, p. 503-12, Dec 2015. ISSN 1873-0329 (Electronic)

1383-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26148816> >.

KANAMURA, H. Y. et al. A comparative epidemiologic study of specific antibodies (IgM and IgA) and parasitological findings in an endemic area of low transmission of *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 2, p. 85-91, Mar-Apr 1998. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755561> >.

KANAMURA, H. Y. et al. *Schistosoma mansoni* heat shock protein 70 elicits an early humoral immune response in *S. mansoni* infected baboons. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 711-6, Jul 2002. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219140> >.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintos (2010-2015)**. Instituto Rene Rachou - Fiocruz. Belo Horizonte: March, 2018. 2018

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, Nov-Dec 1972. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4675644> >.

KINKEL, H. F. et al. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 6, p. 948-53, Jun 2012. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441394> >.

KITTUR, N. et al. Defining Persistent Hotspots: Áreas That Fail to Decrease Meaningfully in Prevalence after Multiple Years of Mass Drug Administration with Praziquantel for Control of *Schistosomiasis*. **Am J Trop Med Hyg**, Sep 25 2017. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29016344> >.

KITTUR, N. et al. Comparison of *Schistosoma mansoni* Prevalence and Intensity of Infection, as Determined by the Circulating Cathodic Antigen Urine Assay or by the Kato-Katz Fecal Assay: A Systematic Review. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 3, p. 605-10, Mar 2016. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755565> >.

KNOPP, S. et al. Diagnosis and treatment of schistosomiasis in children in the era of intensified control. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 11, p. 1237-58, Nov 2013. ISSN 1744-8336 (Electronic)

1478-7210 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24127662> >.

KWATIA, M. A.; BOTKIN, D. J.; WILLIAMS, D. L. Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase. **J Parasitol**, v. 86, n. 5, p. 908-15, Oct 2000. ISSN 0022-3395 (Print)

0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128509> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAMBERTON, P. H. 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, n. 9, p. e3139, Sep 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25211217> >.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-35, Jul 2010. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721485> >.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. An outbreak of acute *Schistosoma mansoni* Schistosomiasis in a nonendemic area of Brazil: a report on 50 cases, including 5 with severe clinical manifestations. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 1, p. e1-6, Jul 2013. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532472> >.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar 1977. ISSN 0006-341X (Print)

0006-341X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843571> >.

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu Rev Biochem**, v. 58, p. 913-49, 1989. ISSN 0066-4154 (Print)

0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2528323> >.

LIM, M. D. et al. Diagnostic tools for soil-transmitted helminths control and elimination programs: A pathway for diagnostic product development. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 3, p. e0006213, Mar 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29494581> >.

LIMA, V. F. et al. A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil. **Parasitol Res**, v. 114, n. 9, p. 3529-33, Sep 2015. ISSN 1432-1955 (Electronic)

0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122998> >.

LINDHOLZ, C. G. et al. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission área in northeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 3, p. e0006274, Mar 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29518081> >.

LOSADA, S. et al. A combined proteomic and immunologic approach for the analysis of *Schistosoma mansoni* cercariae and adult worm protein extracts and the detection of one of the vaccine candidates, Sm28GST, from a Venezuelan parasite isolate. **Invest Clin**, v. 52, n. 2, p. 121-39, Jun 2011. ISSN 0535-5133 (Print)

0535-5133 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866785> >.

LUDOLF, F. et al. Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, p. e2745, Mar 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24651847> >.

LUNDE, M. N.; OTTESEN, E. A.; CHEEVER, A. W. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am J Trop Med Hyg**, v. 28, n. 1, p. 87-91, Jan 1979. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/107819> >.

MABEY, D. et al. Diagnostics for the developing world. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 3, p. 231-40, Mar 2004. ISSN 1740-1526 (Print)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15083158> >.

MAKAROVA, E. et al. Detection of IgG binding to *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26 is a sensitive and specific method for acute schistosomiasis diagnosis. **Parasitol Int**, v. 54, n. 1, p. 69-74, Mar 2005. ISSN 1383-5769 (Print)

1383-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710554> >.

MAKAROVA, E. et al. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. **Parasitol Int**, v. 52, n. 4, p. 269-79, Dec 2003. ISSN 1383-5769 (Print)

1383-5769 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665383> >.

MARINHO, C. C. et al. Morbidity of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 6, p. 805-811, Nov-Dec 2017. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340458> >.

MARTINS, M. J. et al. Morbidity of schistosomiasis in an endemic área of the northeast of the state of Minas Gerais in Brazil: a clinical and sonographic study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1, p. 243-4, 1998. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921360> >.

MATHIESON, W.; WILSON, R. A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 5, p. 617-28, Apr 2010. ISSN 1879-0135 (Electronic)

0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917288> >.

MEEVISSSEN, M. H. et al. Structural characterization of glycans on omega-1, a major *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein that drives Th2 responses. **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2630-42, May 7 2010. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20178377> >.

MOTT, K. E.; DIXON, H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. **Bull World Health Organ**, v. 60, n. 5, p. 729-53, 1982. ISSN 0042-9686 (Print)

0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6983926> >.

MOUNTFORD, A. P.; TROTTEIN, F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 5, p. 221-6, May 2004. ISSN 1471-4922 (Print)

1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105022> >.

MS. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento das Doenças Transmissíveis. , 2014. 144 p.

MUTAPI, F. et al. Praziquantel treatment of individuals exposed to *Schistosoma haematobium* enhances serological recognition of defined parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 192, n. 6, p. 1108-18, Sep 15 2005. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107967> >.

MWINZI, P. N. et al. Additional Evaluation of the Point-of-Contact Circulating Cathodic Antigen Assay for *Schistosoma mansoni* Infection. **Front Public Health**, v. 3, p. 48, 2015. ISSN 2296-2565 (Print)

2296-2565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25853117> >.

NAUSCH, N. et al. Field evaluation of a new antibody-based diagnostic for *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* at the point-of-care in northeast Zimbabwe. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 165, Mar 26 2014. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666689> >.

NENE, V. et al. Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. **Mol Biochem Parasitol**, v. 21, n. 2, p. 179-88, Nov 1986. ISSN 0166-6851 (Print)

0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097539> >.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-62, Jun 1988. ISSN 0173-0835 (Print)

0173-0835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466658> >.

NOYA, B. A. et al. Low transmission áreas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 29-35, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308745> >.

NOYA, O. et al. Laboratory diagnosis of Schistosomiasis in áreas of low transmission: a review of a line of research. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97 Suppl 1, p. 167-9, 2002. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426614> >.

NTDS, U. T. C. London Declaration on Neglected Tropical Diseases. 2012. Disponível em: < http://unitingtocombatntds.org/sites/default/files/resource_file/london_declaration_on_ntds.pdf >. Acesso em: 11/24.

OBUCHOWSKI, N. A.; LIEBER, M. L.; WIANS, F. H., JR. ROC curves in clinical chemistry: uses, misuses, and possible solutions. **Clin Chem**, v. 50, n. 7, p. 1118-25, Jul 2004. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142978> >.

OCHODO, E. A. et al. Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic áreas. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD009579, Mar 11 2015. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25758180> >.

OLIVEIRA, E. J.; KANAMURA, H. Y.; LIMA, D. M. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 421-5, Jul 2005. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113891> >.

OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, v. 93, n. 1, p. 30-5, May 2004. ISSN 0932-0113 (Print)

0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15052469> >.

OLIVEIRA, W. J. et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 2, p. e0006232, Feb 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29470516> >.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, Jul 2002. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094224> >.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. [A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 8, n. 4, p. 589-97, Oct 1956. ISSN 0034-7256 (Print)

0034-7256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13494879> >.

PINHEIRO, M. C. et al. The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in the state of Ceara, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 873-6, Nov 2012. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147142> >.

RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 277-80, Mar-Apr 1995. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531671> >.

_____. Diagnosing schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 669-76, Sep-Oct 1997. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566238> >.

RABELLO, A. L. et al. Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity. **Clin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 608-15, Sep 1995. ISSN 1058-4838 (Print)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8527552> >.

RABELLO, A. L. et al. Stool examination and rectal biopsy in the diagnosis and evaluation of therapy of schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 34, n. 6, p. 601-8, Nov-Dec 1992. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1342131> >.

ROLLINSON, D. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Trop**, v. 128, n. 2, p. 423-40, Nov 2013. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580511> >.

SARHAN, R. M. et al. Comparative analysis of the diagnostic performance of adult, cercarial and egg antigens assessed by ELISA, in the diagnosis of chronic human *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol Res**, v. 113, n. 9, p. 3467-76, Sep 2014. ISSN 1432-1955 (Electronic)

0932-0113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028207> >.

SARVEL, A. K. et al. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e990, Mar 15 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423644> >.

SCHRAMM, G. et al. IPSE/alpha-1: a major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. **Mol Biochem Parasitol**, v. 147, n. 1, p. 9-19, May 2006. ISSN 0166-6851 (Print)

0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480783> >.

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, n. 1, p. e951, Jan 25 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283613> >.

SILVA-MORAES, V. et al. Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 600-4, Aug 2013. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903976> >.

SILVA, J. D. D. F. et al. Detection of schistosomiasis in an área directly affected by the Sao Francisco River large-scale water transposition project in the Northeast of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 658-665, Sep-Oct 2017. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160513> >.

SILVA, L. M. et al. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Trop**, v. 91, n. 2, p. 189-96, Jul 2004. ISSN 0001-706X (Print)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15234668> >.

SILVEIRA, A. M. et al. Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004357, Jan 2016. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752073> >.

SIQUEIRA, L. M. et al. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission área in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 844-50, Nov 2011. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124557> >.

SIQUEIRA, L. M. et al. Performance of POC-CCA(R) in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 3, p. 341-7, May-Jun 2016. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384831> >.

SIQUEIRA, L. M. et al. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission área. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 209-14, Apr 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946244> >.

SMITH, H. et al. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 9, p. e1815, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029577> >.

SOLOMON, A. W. et al. A diagnostics platform for the integrated mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: rationale and target product profiles. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1746, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860146> >.

SORGHO, H. et al. Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. **Acta Trop**, v. 93, n. 2, p. 169-80, Feb 2005. ISSN 0001-706X (Print)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652331> >.

SOUSA-FIGUEIREDO, J. C. et al. Mapping of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminths in Namibia: The First Large-Scale Protocol to Formally Include Rapid Diagnostic Tests. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 7, p. e0003831, 2015. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26196386> >.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-25, Jul 2006. ISSN 1473-3099 (Print)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790382> >.

STOTHARD, J. R. et al. *Schistosoma mansoni* Infections in young children: when are schistosome antigens in urine, eggs in stool and antibodies to eggs first detectable? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e938, Jan 04 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245910> >.

SULBARAN, G. S. et al. Detection of the Sm31 antigen in sera of *Schistosoma mansoni*-infected patients from a low endemic area. **Parasite Immunol**, v. 32, n. 1, p. 20-8, Jan 2010. ISSN 1365-3024 (Electronic)

0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042004> >.

TANIGAWA, C. et al. Species-Specific Serological Detection for Schistosomiasis by Serine Protease Inhibitor (SERPIN) in Multiplex Assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, p. e0004021, 2015. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291988> >.

TCHUEM TCHUENTE, L. A. et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1758, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860148> >.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439> >.

UTZINGER, J. et al. New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 6, p. 529-42, Jun 2015. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843503> >.

UTZINGER, J. et al. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Trop**, v. 120 Suppl 1, p. S121-37, Sep 2011. ISSN 1873-6254 (Electronic)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20831855> >.

UTZINGER, J.; TANNER, M.; KEISER, J. ACTs for schistosomiasis: do they act? **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 9, p. 579-81, Sep 2010. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705514> >.

VALLI, L. C. et al. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 2, p. 302-7, Aug 1999. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463684> >.

VALLI, L. C. et al. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of and serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 57, n. 3, p. 358-62, Sep 1997. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311650> >.

VAN BALKOM, B. W. et al. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **J Proteome Res**, v. 4, n. 3, p. 958-66, May-Jun 2005. ISSN 1535-3893 (Print)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952743> >.

VAN DAM, G. J. et al. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. **Eur J Biochem**, v. 225, n. 1, p. 467-82, Oct 01 1994. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925469> >.

VAN DAM, G. J. et al. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. **J Parasitol**, v. 82, n. 4, p. 557-64, Aug 1996. ISSN 0022-3395 (Print)

0022-3395 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691363> >.

VAN DAM, G. J. et al. A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of Schistosoma circulating anodic antigen. **Exp Parasitol**, v. 135, n. 2, p. 274-82, Oct 2013. ISSN 1090-2449 (Electronic)

0014-4894 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850995> >.

VAN DAM, G. J. et al. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5458-61, Dec 2004. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583265> >.

VAN DER WERF, M. J. et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop**, v. 86, n. 2-3, p. 125-39, May 2003. ISSN 0001-706X (Print)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745133> >.

VAN GOOL, T. et al. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with Schistosoma mansoni adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with S. mansoni egg antigens. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 9, p. 3432-7, Sep 2002. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202589> >.

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, n. 3, p. 311-2, May-Jun 1993. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8236404> >.

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A. M.; DEELDER, A. M. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. **Acta Trop**, v. 77, n. 1, p. 69-80, Oct 23 2000. ISSN 0001-706X (Print)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996122> >.

VENDRAME, C. M. et al. Evaluation of anti-Schistosoma mansoni IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 43, n. 3, p. 153-9, May-Jun 2001. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452324> >.

VERWEIJ, J. J. et al. Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n. 1, p. 48-50, Jan-Feb 1995. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747306> >.

VERWEIJ, J. J.; STENSVOLD, C. R. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 2, p. 371-418, Apr 2014. ISSN 1098-6618 (Electronic)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696439> >.

WHO. Helminth control in school-age children: A guide for managers of control programmes. Geneva p. xii; 75 p, September/2011 2011. ISSN 978 92 4 150 312 9. Disponível em: < http://apps.WHO.int/iris/bitstream/handle/10665/44671/9789241548267_eng.pdf?sequence=1 >.

_____. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases. A roadmap for implementation., 2012a. Disponível em: < http://www.WHO.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf?ua=1 >. Acesso em: 11/24.

_____. Integrated preventive chemotherapy for neglected tropical diseases: estimation of the number of interventions required and delivered, 2009-2010. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 87, n. 2, p. 17-27, Jan 13 2012b. ISSN 0049-8114 (Print)

0049-8114 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22242234> >.

_____. **WHA65.21. Elimination of schistosomiasis.** Sixty-Fifth World Health Assembly. Geneva, Switzerland: WHO: 36-37 p. 2012c.

_____. Progress Report 2001–2011 and Strategic Plan 2012–2020. Geneva, 2013. Disponível em: < <http://www.WHO.int/iris/handle/10665/78074> >. Acesso em: 11/24.

_____. **ACCELERATING PROGRESS on HIV, tuberculosis, malaria, hepatitis and neglected tropical diseases. A new agenda for 2016-2030.** Paris, France 2016a.

_____. Global Health Estimates 2015: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Geneva, 2016b. Disponível em: < http://www.WHO.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index2.html >.

_____. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 91, n. 5, p. 53-60, Feb 5 2016c. ISSN 0049-8114 (Print)

0049-8114 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852429> >.

_____. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2016. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 92, p. 749-760, Dec 08 2017. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <http://apps.WHO.int/iris/bitstream/handle/10665/259593/WER9249.pdf?sequence=1> >.

WHO/PAHO. Schistosomiasis Regional Meeting. Defining a road map toward verification of elimination of schistosomiasis transmission in Latin America and the Caribbean by 2020. 2014. Disponível em: < http://www.PAHO.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=28841&lang=en >. Acesso em: 11/24.

_____. Neglected infectious diseases in the Americas: Success stories and innovation to reach the neediest., 2016. ISSN 978-92-75-11896-2. Disponível em: < <http://www.PAHO.org/neglected-infectious-diseases-stories/http://iris.PAHO.org/xmlui/handle/123456789/31250> >. Acesso em: 11/24.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 148-54, Feb-Mar 2007. ISSN 0818-9641 (Print)
0818-9641 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160074> >.

WILSON, S. et al. Posttreatment changes in cytokines induced by *Schistosoma mansoni* egg and worm antigens: dissociation of immunity- and morbidity-associated type 2 responses. **J Infect Dis**, v. 209, n. 11, p. 1792-800, Jun 1 2014. ISSN 1537-6613 (Electronic)
0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357629> >.

WOODWARD, M. P.; YOUNG, W. W., JR.; BLOODGOOD, R. A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. **J Immunol Methods**, v. 78, n. 1, p. 143-53, Apr 8 1985. ISSN 0022-1759 (Print)
0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2580026> >.

WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 3, p. 245-57, Aug 2010. ISSN 1098-8971 (Electronic)
0272-8087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665377> >.

ZHANG, M. et al. Screening diagnostic candidates for schistosomiasis from tegument proteins of adult *Schistosoma japonicum* using an immunoproteomic approach. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003454, Feb 2015. ISSN 1935-2735 (Electronic)
1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25706299> >.

ZHONG, Z. R. et al. Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of *Schistosomiasis japonica*. **Acta Trop**, v. 116, n. 1, p. 1-8, Oct 2010. ISSN 1873-6254 (Electronic)
0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451489> >.

ANEXOS

Anexo I

1 Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic
2 areas?

3

4 Vanessa Silva-Moraes^{a, d*}, Lisa M Shollenberger^{a, e}, Liliane Maria Vidal Siqueira^a, William
5 Castro-Borges^c, Donald A Ham^d, Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz^{a, d}, Ana Lucia Teles
6 Rabello^b, Paulo Marcos Zech Coelho^a

7

8 ^aBiologia do *Schistosoma mansoni* e sua interação com o hospedeiro, Instituto Rene Rachou,
9 Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Avenida Augusto de Lima 1715 Belo Horizonte, Minas
10 Gerais, Brazil. 30190-002. Phone: +55 31-3349-7759

11

12 ^bGrupo de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias,
13 Instituto Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Avenida Augusto de Lima 1715
14 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 30190-002. Phone: +55 31-3349-7708

15

16 ^cLaboratório de Enzimologia e Proteômica, Universidade Federal de Ouro Preto. Campus
17 Universitário Morro do Cruzeiro - Bauxita, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. 35400-000.
18 Phone: +55 31-3559-1705

19

20 ^dDepartment of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, University of Georgia.
21 501 DW Brooks Drive, Athens, Georgia, United States of America. 30602-7387. Phone: +1
22 706-542-4573

23

24 ^eDepartment of Biological Sciences, Old Dominion University, Norfolk, Virginia, United
25 States of America. 30602-7387. Phone: +1 706-542-4573



Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas?

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	MIOC-2018-0478.R1
Manuscript Type:	Invited Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva-Moraes, Vanessa; University of Georgia, Infectious Diseases; Instituto Rene Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i> e sua interação com o hospedeiro Shollenberger, Lisa ; Old Dominion University, Biological Sciences; Instituto Rene Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i> e sua interação com o hospedeiro SIQUEIRA, LILIANE; Universidade Federal de Ouro Preto, Faculdade de Medicina Castro-Borges, William; Universidade Federal de Ouro Preto, Ham, Donald; University of Georgia, Infectious Diseases Grenfell, Rafaella; Instituto Rene Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i> e sua interação com o hospedeiro; University of Georgia, Infectious Diseases Rabello, Ana; Instituto Rene Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Grupo de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias Coelho, Paulo Marcos; Instituto Rene Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i> e sua interação com o hospedeiro
Keyword:	Diagnosis, Low-endemic area, POC-CCA, Immunoassay, <i>Schistosoma mansoni</i>
Theme:	Infectious Disease, Diagnostics, Schistosomiasis

Anexo
II

1 Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the
2 diagnosis of low-intensity infections in endemic area in Brazil
3 Antigen target in schistosomiasis diagnosis

4

5 Vanessa Silva-Moraes^{1*, #a}, Lisa M Shollenberger^{2&, #b}, William Castro-Borges³, Ana Lucia
6 Teles Rabello⁴, Donald A Ham², Lia Carolina Soares Medeiros⁵, Wander de Jesus Jeremias¹,
7 Liliane Maria Vidal Siqueira¹, Caroline Stephane Salviano Pereira¹, Maria Luysa Camargos
8 Pedrosa¹, Nathalie Bonatti Franco Almeida¹, Aureo Almeida¹, Jose Roberto Lambertucci⁶,
9 Nidia Francisca de Figueiredo Carneiro⁷, Paulo Marcos Zech Coelho^{1&}, Rafaella Fortini
10 Grenfell e Queiroz^{1,2&}

11

12 ¹Biologia do *Schistosoma mansoni* e sua interação com o hospedeiro, Instituto Rene Rachou,
13 Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

14 ² Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, University of Georgia.
15 Athens, Georgia, United States of America.

16 ³Laboratório de Enzimologia e Proteomica, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto,
17 Minas Gerais, Brazil.

18 ⁴Grupo de Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias,
19 Instituto Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

20 ⁵Laboratório de Biologia celular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Curitiba,
21 Paraná, Brazil.

22 ⁶Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

23 ⁷Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil.

24 ^{#a} Current address: Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine,
25 University of Georgia. Athens, Georgia, United States of America.

PLOS Neglected Tropical Diseases

Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity infections in endemic area in Brazil –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity infections in endemic area in Brazil
Short Title:	Antigen target in schistosomiasis diagnosis
Article Type:	Research Article
Keywords:	
Corresponding Author:	Vanessa Silva Moraes, Ph.D. University of Georgia Athens, GA UNITED STATES
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Georgia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Vanessa Silva-Moraes, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Vanessa Silva-Moraes, Ph.D. Lisa Marie Shollenberger William Castro-Borges Ana Lucia Teles Rabello Donald A Ham Lia Carolina Soares Medeiros Wander de Jesus Jeremias Liliane Maria Vidal Siqueira Caroline Stephane Salviano Pereira Maria Luysa Camargos Pedrosa Nathalie Bonatti Franco Almeida Aureo Almeida Jose Roberto Lambertucci Nidia Francisca Figueiredo Carneiro Paulo Marcos Zech Coelho Rafaella Fortini Queiroz Grenfell
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Background: Despite decades of employment of control programs, schistosomiasis remains a global public health problem. To further reduce prevalence and intensity of infection, or to achieve the goal of elimination in low-endemic areas, there need to be better diagnostic tools to detect low intensity infections in low-endemic areas as Brazil. The rationale for development of new diagnostic tools is because in low-endemic settings, the standard Kato-Katz diagnostic method loses its sensitivity and misses low intensity infections. To develop new diagnostic tools, we employed a proteomics