

**Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM**



**Lílian Christina Nóbrega Holsbach Beck**

**AVALIAÇÃO DE ABORDAGENS SOROLÓGICAS  
PARA DISCRIMINAÇÃO DAS FORMAS AGUDA E  
CRÔNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA  
HUMANA**

**Recife, 2007**

**Lílian Christina Nóbrega Holsbach Beck**

**AVALIAÇÃO DE ABORDAGENS SOROLÓGICAS PARA  
DISCRIMINAÇÃO DAS FORMAS AGUDA E CRÔNICAS DA  
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadores:

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro  
Departamento de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Tereza Cristina Favre  
Laboratório de Ecoepidemiologia e Controle da Esquistossomose e Geohelmintoses  
Departamento de Biologia - IOC/FIOCRUZ

2007

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

B393a Beck, Lílian Christina Nóbrega Holsbach.

Avaliação de abordagens sorológicas para a discriminação das formas agudas e crônicas da esquistossomose mansônica humana/ Lílian Christina Nóbrega Holsbach Beck. — Recife: L. C. N. H. Beck, 2007.

80 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007, 24 abr. 2007.

Orientadoras: Silvia Maria Lucena Montenegro e Tereza Cristina Favre.

1. Esquistossomose Mansonii. 2. Diagnóstico Diferencial. 3. Testes Sorológicos. I. Montenegro, Silvia Maria Lucena. II. Favre, Tereza Cristina. I. Título.

CDU 616.995.122

---

**Lílian Christina Nóbrega Holsbach Beck**

**AVALIAÇÃO DE ABORDAGENS SOROLÓGICAS PARA  
DISCRIMINAÇÃO DAS FORMAS AGUDA E CRÔNICAS DA  
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Aprovada em 25/04/2007.

**Banca Examinadora**

---

**Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro  
(Orientadora) CPqAM – FIOCRUZ**

---

**Dra. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa  
(Titular – Depto. Parasitologia – CPqAM- Fiocruz)**

---

**Dra. Elizabeth Malagueño  
(Titular – Depto. Medicina Tropical – UFPE)**

---

**Dra. Yara de Miranda Gomes  
(Suplente – Depto. Imunologia – CPqAM – Fiocruz)**

---

**Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza  
(Suplente – Depto. Ciências Farmacêuticas – UFPE)**

Dedico aos meus pais Pedro e Perciliana;

A minha irmã Mônica;

A minha filha Caroline;

Pelo amor, dedicação, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida.

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Frederico Abath (*In Memoriam*) por seu apoio, incentivo, disponibilidade amizade e profissionalismo.

A Dra. Silvia Montenegro pelo apoio, amizade, confiança e generosidade a mim conferidos indispensáveis ao meu crescimento profissional.

A Dra. Tereza Favre por toda amizade, dedicação, credibilidade, generosidade, força, carinho, paciência e companheirismo durante toda a minha carreira profissional.

Ao Dr. Otávio Pieri por toda a sua generosidade, apoio e por oportunizar o meu crescimento profissional.

A Wlademir pela amizade e paciência nos ensinamentos de laboratório.

A Dra. Yara Gomes pela colaboração e apoio durante a realização deste estudo.

A Dra. Constança Barbosa pela amizade, seriedade, profissionalismo e por oportunizar a parceria indispensável para a realização deste estudo.

A Coordenação do programa de pós-graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM).

A todos do CPqAM que participaram direta ou indiretamente da realização dessa dissertação.

A equipe do Serviço de Referência em Esquistossomose do CPqAM, Lúcia, Barnabé, Maria de Fátima, Fernando, Robson, Manoel e Severino Francisco (Magal) pelo carinho, amizade, apoio e profissionalismo dedicados a mim durante todo o desenvolvimento desse estudo.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado por compartilharem comigo bons momentos durante o período do curso.

A todos do Departamento de Biologia do Instituto Oswaldo Cruz que participaram direta ou indiretamente na realização deste estudo.

A Antônio Henrique, Aline, Ana Paula, Katherine, Luciana, Maria de Fátima e Tatiana do Laboratório de Epidemiologia e Controle da Esquistossomose e Geohelmintoses do Departamento de Biologia – IOC, pelo apoio, amizade e companheirismo.

A Dra. Míriam Tandler, do Departamento de Helminologia – IOC, pelo fornecimento do antígeno recombinante Sm14.

A todos os meus amigos Adriano, Ângela, Clarice, Cristiana, Eduardo Henrique, Juliana Carla, Érika, Daniele, Gisele, Joelma, Edeneide, Edylene, Marina, Simone e Zeneida pela força, amizade, paciência e confiança.

A família Dantas, em especial meu querido amigo Daniel, pela acolhida, amizade, confiança, lealdade e carinho.

Ao Renan Alves pela sua compreensão, companheirismo, amizade, carinho e amor.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

## RESUMO

A diferenciação entre as fases aguda e crônica da esquistossomose se baseia em dados clínicos e epidemiológicos associados ao diagnóstico sorológico. Essa diferenciação é importante para definir o tratamento, pois este, nos casos agudos alivia as manifestações alérgicas e evita a evolução e o agravamento do quadro clínico. Vários testes têm sido propostos para diferenciar essas fases clínicas, porém as discordâncias entre os autores justificam uma reavaliação do tema. Para o estudo foram selecionados 54 pacientes com a fase aguda, oriundos de Porto de Galinhas, Ipojuca-PE, 54 pacientes com a fase crônica e nove pacientes com outras helmintoses, ambos oriundos São Lourenço da Mata-PE. O grupo controle foi formado por 15 indivíduos com diagnóstico negativo para *S. mansoni* e sem história de banho de rios, residentes no município do Recife-PE. Os anticorpos IgG, IgM e IgA contra SEA, IgG e IgM contra KLH e SWAP e IgG e IgA contra o antígeno recombinante Sm14 foram quantificados através de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). A curva ROC (receiving operating characteristics) foi empregada para avaliar a capacidade dos antígenos de diferenciar as duas fases clínicas. Os anticorpos IgA anti-SEA (AACs = 0,877) e o IgM anti-KLH (AACs = 0,825) demonstraram maior capacidade para discriminar o grupo de pacientes agudos dos crônicos. Os níveis de anticorpos IgG anti-SEA (AACs = 0,847) e anti-SWAP (AACs = 0,958) não só mostraram melhor capacidade para diferenciar os grupos dos pacientes agudos e dos indivíduos sem esquistossomose, mas também diferenciaram o grupo dos pacientes crônicos daquele sem esquistossomose (AACs = 0,720 e AACs = 0,905, respectivamente). Os níveis de IgG anti-SEA (AACs = 0,784) e anti-SWAP (AACs = 0,931) permitiram discriminar o grupo de agudos e crônicos em conjunto (infectados) daqueles não infectados com *S. mansoni*. O antígeno Sm14 não mostrou eficiência em nenhum dos testes utilizados. Os dados mostram que é possível discriminar os pacientes esquistossomóticos agudos dos crônicos, utilizando uma combinação de testes sorológicos, baseado em ELISA avaliando os níveis de IgA anti-SEA e IgM anti-KLH, em associação com os dados clínicos e epidemiológicos.

Palavras Chave: *Schistosoma mansoni*, diagnóstico diferencial, KLH, SEA, SWAP.



## ABSTRACT

The differentiation between the acute and chronic phases of schistosomiasis is based on clinical and epidemiological data associated to serological tests. This differentiation is important to define the treatment, since in the acute cases it reduces the allergic manifestations and prevents the evolution and aggravation of the clinical forms of the disease. Several serological tests have been proposed to differentiate these clinical stages, however the disagreement among the authors justify a reassessment of the subject. For this study 54 patients with acute schistosomiasis from Porto de Galinhas, Ipojuca, State of Pernambuco (PE), have been selected, 54 patients with the chronic forms and nine patients with other helminthiasis, these two latter groups from São Lourenço da Mata, PE. The control group was formed by 15 individuals, from Recife, PE with negative diagnosis for *Schistosoma mansoni* and without contact with *S.mansoni* infected water. The IgG, IgM and IgA antibodies response to SEA, IgG and IgM to KLH and SWAP, and IgG and IgA to the recombinant antigen Sm14 were measured by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). ROC curve (receiving operating characteristics) was used to evaluate the capacity of antigens to differentiate the two phases of disease. The anti-SEA IgA (AACs = 0,877) and the anti-KLH IgM (AACs = 0,825) had demonstrated a greater capacity to discriminate the acute from chronic patients. The levels of anti-SEA (AACs = 0,847) and anti-SWAP (AACs = 0,958) IgG showed better performance to differentiate the group of the acute patients from the individuals without schistosomiasis, but also differentiated the chronic patients from those without schistosomiasis (AACs = 0,720 and AACs = 0,905, respectively). The levels of anti-SEA (AACs = 0,784) and anti-SWAP (AACs = 0.931) IgG allowed to discriminate the acute and chronic patients (infected) from those not infected with *S. mansoni*. The Sm14 antigen did not show efficiency for the used tests. The data showed that it is possible to discriminate acute from chronic patients, using a combination of serological tests, based on ELISA assessment of levels of anti-SEA IgA and anti-KLH IgM, in association with clinical and epidemiological data.

Key words: *Schistosoma mansoni*, differential diagnosis, KLH, SEA, SWAP.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	18
<b>Figura 2</b> Distribuição da Esquistossomose no Brasil	19
<b>Figura 3</b> Mapa do Estado de Pernambuco destacando a Região Metropolitana do Recife, bem como os municípios de Recife, São Lourenço da Mata e Ipojuca, de onde foram selecionados os sujeitos do estudo	40
<b>Figura 4</b> Áreas residenciais alagadas em Porto de Galinhas, município de Ipojuca, Pernambuco, após fortes chuvas ocorridas durante o mês de julho de 2002	42
<b>Figura 5</b> Áreas do Engenho Araújo, município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, mostrando o detalhe de residências e do riacho utilizado pela população local para várias atividades domésticas e de lazer.	44
<b>Figura 6</b> A curva ROC mostra a capacidade de alguns testes estudados discriminarem as fases aguda e crônica da esquistossomose.	55

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação das formas aguda e crônica da esquistossomose	54
<b>Tabela 2</b> Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação de pacientes com infecção aguda e de pacientes sem esquistossomose	57
<b>Tabela 3</b> Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação de pacientes com infecção crônica daqueles pacientes sem esquistossomose	59
<b>Tabela 4</b> Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação de pacientes com infecção aguda e crônica da esquistossomose daqueles pacientes sem esquistossomose	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACs	Área Gerada Abaixo da Curva ROC
ABTS	”(2.2'-azino-di[3-ethylbenzithiazoline sulfonate(6)])
AWA	Fração de Antígenos Adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>
AWA-TCA	Fração de Antígenos Adultos de <i>S. mansoni</i> , Solúvel em Ácido Tricloroacético
Curva ROC	“Receiver Operating Characteristics”
CO	“Cut-Off”
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
D.O.	Densidade Ótica
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HAMA	Antígeno Microssomal de Verme Adulto de <i>Schistosoma haematobium</i>
HI	Hemaglutinação Indireta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IgA	Imunoglobulina Humana Isotipo A
IgE	Imunoglobulina Humana Isotipo E
IgG	Imunoglobulina Humana Isotipo G
IgM	Imunoglobulina Humana Isotipo M
IFI	Imunofluorescência Indireta
JAMA	Antígeno Microssomal de Verme Adulto de <i>Schistosoma japonicum</i>
kDa	Kilodalton
KLH	“Keyhole Limpet Haemocyanin”
LR	“Likelihood Ratio” ou Razão de Probabilidade
MAMA	Antígeno Microssomal de Verme Adulto de <i>S. mansoni</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Ovos por Grama de Fezes
OR	“Odds Ratio”
PBS Tween 20	“Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate” + Tampão PBS
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose

PCR	“Polymerase chain Reaction”
RP26	Antígeno Recombinante de <i>S. Mansoni</i>
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate”
SEA	“Soluble Egg Antigen” (antígeno solúvel de ovo)
Sm14	Antígeno Recombinante de <i>S. Mansoni</i>
Sm31/32	Antígeno Solúvel de <i>S. Mansoni</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SWAP	“Soluble Worm Antigen Preparation” (preparação solúvel de verme adulto)
UAE	Unidade Arbitrária de ELISA
WHO	“World Health Organization” (Organização Mundial de Saúde)

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 O PARASITA	17
1.2 <u>A ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL</u>	19
1.2.1 A esquistossomose no estado de Pernambuco	22
1.3 <i>AS FORMAS CLÍNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE</i>	25
1.4 <i>Diagnóstico da esquistossomose</i>	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>3 PERGUNTA CONDUTORA</b>	37
<b>4 OBJETIVOS</b>	38
4.1 GERAIS	38
4.1 <u>ESPECÍFICOS</u>	38
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
5.1 SELEÇÃO DE SUJEITOS	39
5.2 <u>OBTENÇÃO DE PLASMA</u>	46
5.3 Antígenos utilizados	47
5.4 <i>DETECÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELISA</i>	48
5.5 <i>Análise estatística</i>	50
5.6 <u>Aspectos éticos</u>	52
<b>6 RESULTADOS</b>	53
6.1 DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM A FORMA AGUDA E CRÔNICA DA ESQUISTOSSOMOSE	53
6.2. <u>DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM A FORMA AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE COMPARADOS A INDIVÍDUOS SEM ESQUISTOSSOMOSE E PACIENTES INFECTADOS COM OUTRAS HELMINTOSES</u>	56
6.3. Discriminação dos grupos de pacientes com a forma crônica comparados a indivíduos sem esquistossomose e pacientes infectados com outras helmintoses	58
6.4. <i>DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM AS FORMAS AGUDA E CRÔNICA DA ESQUISTOSSOMOSE COMPARADOS A</i>	60

*INDIVÍDUOS SEM ESQUISTOSSOMOSE E PACIENTES  
INFECTADOS COM OUTRAS HELMINTOSES*

<b>7. DISCUSSÃO</b>	62
<b>8. CONCLUSÕES</b>	66
<b>REFERÊNCIAS</b>	67

## **ANEXOS**

ANEXO A APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## **APÊNDICES**

ANEXO A ARTIGO PUBLICADO

ANEXO B ARTIGO EM PREPARAÇÃO



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O PARASITA

A esquistossomose foi descrita primeiramente por Bilharz, em 1851, ficando conhecida como bilharziose. Em 1907, Sambon descreveu espécie que já havia sido observada por Manson, em 1892, e a denominou de *Schistosoma mansoni*. Na mesma época, Pirajá da Silva descreveu o primeiro relato da infecção por *S. mansoni* no Brasil (PESSÔA, MARTINS, 1982; ROSS *et al.*, 2002).

As principais espécies do gênero *Schistosoma* agentes etiológicos da doença humana são:

(a) *Schistosoma haematobium*, responsável pela infecção urogenital, endêmico na África e região oriental do mediterrâneo;

(b) *S. japonicum*, responsável pela infecção do intestino delgado, endêmico nos países do sudeste Asiático e do área Ocidental do Pacífico;

(c) *S. mansoni*, responsável pela infecção do intestino grosso, endêmico em países da África, América do Sul e Antilhas.

Outras espécies como *S. mekongi*, que ocorre em área restrita da Ásia, *S. Intercalatum*, *S. bovis* e *S. Mattheei*, que ocorrem nos países da África também podem ter importância médica.

No Brasil, a única espécie presente é o *S. mansoni*, responsável pela infecção no homem e outras espécies de mamíferos, normalmente roedores silvestres e, mais raramente, marsupiais (REY, 2001). Sua ocorrência está associada à presença *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY, 1835) e *Biomphalaria straminea* (DUNKER, 1848), espécies de molusco de água doce que atuam como hospedeiros intermediários naturais do parasito e que estão distribuídos por quase todo território nacional.

O *S. mansoni* tem ciclo de vida complexo, envolvendo reprodução assexuada em um hospedeiro invertebrado e, sexuada em um hospedeiro vertebrado (Figura 1). O ciclo de vida se inicia com a deposição de fezes contendo ovos do parasita no ambiente aquático, que eclodem liberando os miracídios. Eles penetram no molusco

*Biomphalaria* suscetível através das partes moles e sofrem transformações morfológicas e um processo de multiplicação assexuada que, ao término de 25 dias, em média, resultará na produção de cercárias. Elas são liberadas na água, nadam ativamente e encontrando o hospedeiro definitivo, penetram através da pele ou mucosas, durante banhos em águas contaminadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993). Ao penetrarem na pele, as cercárias perdem a cauda dando origem aos esquistossômulos, que podem penetrar em um vaso sanguíneo ou linfático e daí são passivamente levados para os pulmões. Eles chegam ao coração esquerdo e são enviados pela circulação sistêmica a todas as partes do corpo. Entretanto, quando alcançam o sistema porta intra-hepático, se transformam em vermes adultos e vão para as vênulas mesentéricas, onde se acasalam e as fêmeas produzem os ovos (MILLER, WILSON, 1978, 1980). Os ovos com seu característico espículo lateral ultrapassam a mucosa intestinal e são eliminados junto com as fezes podendo ser detectados cerca de 40 dias após a infecção.

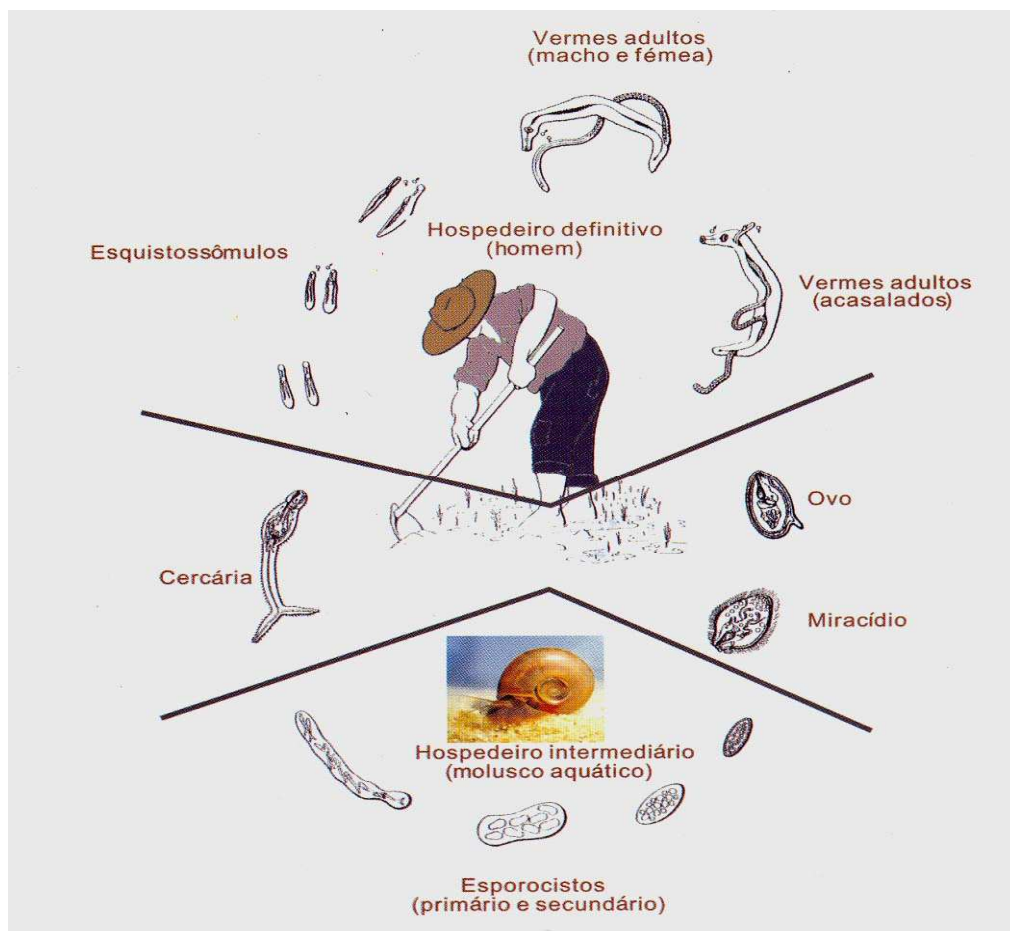


Figura 1: Ciclo de vida do *S. mansoni*. Fonte: Adaptado (PESSÔA, MARTINS, 1977).

## 1.2 A ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL

No país, existem áreas de alta, média e baixa endemicidade da esquistossomose. As áreas endêmicas de maior prevalência encontram-se nos estados do Nordeste, principalmente Pernambuco, Alagoas e Bahia e nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Porém, a transmissão ocorre em uma vasta área desde o Maranhão até o Espírito Santo. Focos isolados foram assinalados nos estados do Amapá, Pará, Piauí, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, no Distrito Federal e em vários estados do sudeste, entre eles, Rio de Janeiro, São Paulo, e em estados do sul, como Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 2). Além disso, há registros de casos importados de áreas endêmicas em todo o território nacional, principalmente em estados considerados pontos de migração, como Rondônia (COURA, AMARAL, 2004).

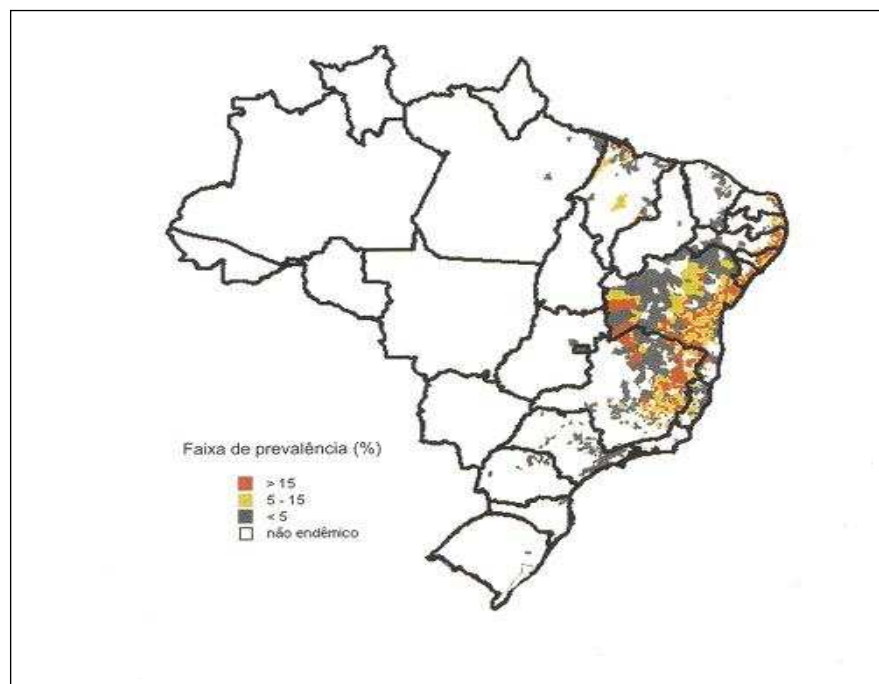


Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil. Fonte: (Gerência do Programa Nacional de Controle de Esquistossomose/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 1998).

Os programas oficiais de controle da esquistossomose no país se basearam quase que exclusivamente em campanhas periódicas de tratamento dos portadores da infecção. O controle de moluscos vetores, através da aplicação de moluscicida (niclosamida), também foi levado a efeito, porém em menor escala e de forma irregular. Desde a implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), em 1977, até 1999 a droga empregada pelo Ministério de Saúde no tratamento da esquistossomose era o oxamniquine (Mansil), administrado em dose única, que conferia uma taxa de cura na faixa de 65% a 85%. Devido ao alto custo do oxamniquine e de algumas evidências de tolerância de *S. mansoni* à droga, outro fármaco, o praziquantel, foi introduzido pelo Ministério para substituir o anterior, por ser mais barato, conferir uma taxa de cura entre 60 e 90% e redução de contagem de ovos de 90 a 95% naqueles casos que não são curados (FAVRE, 1999)

Várias campanhas de controle foram implementadas entre 1977 e 1996 pelo Ministério da Saúde nas áreas endêmicas da esquistossomose no país, cada uma delas incluindo inquérito parasitológico e tratamento dos portadores da infecção, já que vários estudos mostravam o efeito benéfico das drogas terapêuticas na prevenção e redução das formas graves da doença (BINA 1981, 1992; PRATA 1976, 2004; ANDRADE, AZEVEDO 1987, 1989). Nessas campanhas a única mudança considerável no tratamento dos portadores da infecção foi à abrangência com que a droga foi administrada nas comunidades. A partir de 1990, com a adoção de inquéritos censitários, que implica na realização de exames parasitológicos em toda a população, o tratamento passou a ser seletivo, incluindo apenas os portadores de infecção e as pessoas que conviviam na mesma residência (FAVRE *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos as diretrizes do Ministério para avaliação e controle da esquistossomose se refletem claramente nas mudanças de prioridades quanto aos objetivos e as medidas de controle. Até 1980, o objetivo era exclusivamente o controle da transmissão; a partir daí a ênfase passou para o controle da morbidade. Quanto às estratégias, o controle químico dos moluscos predominou até o início dos anos 80, sendo substituído pelo controle quimioterápico seletivo até o final da década de 90. Outras medidas de controle, como saneamento, abastecimento de água e educação em saúde, embora recomendadas, não tiveram prioridade ao longo das décadas (FAVRE *et al.*, 2001).

De acordo com Sabroza e Leal (1992), os programas de controle da esquistossomose tiveram algum êxito na redução da prevalência em algumas áreas porém, não foram capazes de gerar uma mudança substancial na estimativa global do número de pessoas infectadas ou sob o risco de contrair a doença. Para os autores o crescimento contínuo da população, a degradação ambiental, a falta de sistemas adequados de saneamento e abastecimento de água, bem como aos movimentos migratórios das populações foram as principais causas para a ausência de impacto das ações de controle implementadas pelo Ministério. Por outro lado, algumas estratégias para reduzir a prevalência e/ou interromper a transmissão podem ser executadas a curto e longo prazo, algumas delas já tendo sido aplicadas com sucesso em países como Portugal, Tunísia, Chipre, Israel e Japão, países onde a doença foi erradicada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993; REY, 2001).

De acordo com Katz e Peixoto (2000), com base em informações da Fundação Nacional de Saúde, cerca de 25 milhões de pessoas podem estar expostas ao risco de infecção e pelo menos 2,5 milhões já estão infectadas, pelo *S. mansoni*, no país. Os autores ressaltam que essa estimativa pode não corresponder à realidade e sugerem a realização de um levantamento nacional de prevalência a fim de levantar a real situação da esquistossomose no país.

### 1.2.1 A esquistossomose no estado de Pernambuco

Em Pernambuco a esquistossomose é historicamente considerada uma doença crônica rural endêmica (COUTINHO *et al.*, 1997), afetando pessoas de baixa renda (BARBOSA *et al.*, 2000). Sua área endêmica abrange 79 (47%) dos 167 municípios do Estado, o que corresponde a 17,5% do território total. Daqueles 79 municípios, 55 (69,6%) estão na Zona Litoral – Mata e 24 (30,4%), no Agreste. Segundo o censo demográfico de 2000, cerca de cinco milhões de pessoas residem na área endêmica, o que coloca 62% da população total do Estado sob risco de infecção (FAVRE *et al.*, 2001).

Duas espécies de molusco são responsáveis pela transmissão da esquistossomose em Pernambuco, *B. glabrata* e *B. straminea*. A primeira delas predomina no Litoral, estendendo-se para o interior apenas em poucos municípios ao Sul da área endêmica. *B. straminea* tem larga faixa de distribuição, sendo encontrada praticamente em todos os municípios da área endêmica do Litoral até o Agreste (FAVRE *et al.*, 2001, 2002).

A Zona da Mata propriamente dita é uma das áreas mais problemáticas da esquistossomose, ocupando 8.456 km<sup>2</sup> entre as coordenadas 35° - 36°W e 7° - 9° S. Ela engloba 43 municípios, totalizando 1,2 milhões de habitantes, 31% dos quais residem em áreas rurais, segundo estimativa do IBGE (FAVRE *et al.*, 2001). Ela possui maior concentração demográfica rural do Estado e seus municípios registram os maiores índices de prevalência da esquistossomose. A última avaliação feita pelo Ministério da Saúde, entre 1996 e 1999, revelou que 35 dos seus municípios registravam prevalência acima de 10% e muitas localidades apresentavam prevalência igual ou acima de 50%. (FAVRE *et al.*, 2001).

Em 1999, o Ministério da Saúde descentralizou as atividades de vigilância e controle da doença e os municípios passaram a ser responsáveis por essas atividades dentro do Sistema Único de Saúde (SUS). A análise dos dados de prevalência levantados pelo Programa de Controle da Esquistossomose (PCE-SUS), entre 2002 e 2004, mostra que 21 dos 43 municípios da Zona da Mata registraram prevalência acima de 10%. Essa mesma análise revelou que somente em 12 daqueles 43 municípios, as estimativas de prevalência atenderam aos critérios

mínimos de representatividade coletados, ou seja, municípios onde um mínimo de 55 indivíduos foram examinados, em pelo menos cinco localidades, totalizando 275 exames de fezes (FAVRE *et al.*, 2006a, 2006b).

Um inquérito parasitológico amostral realizado recentemente com 15.257 escolares de 271 escolas nos 43 municípios da Zona da Mata revelou que 25 (58%) municípios se enquadraram na classe de prevalência moderada, entre 10% e 50%, e os demais, na classe de prevalência abaixo de 10%. A média geométrica de ovos nas fezes foi 67,9 entre os escolares com diagnóstico positivo para *S. mansoni* (BARBOSA *et al.*, 2006).

A manutenção da endemia nas áreas rurais de Pernambuco, como em tantas outras, está relacionada ao baixo desenvolvimento econômico da região, onde o modelo agrícola está voltado para monocultura. Esse modelo é formado principalmente por grandes latifúndios que concentram o capital e terras produtivas, deixando inativa uma expressiva força humana de trabalho. Essa realidade, imposta a uma grande parcela da população rural, tem atraído trabalhadores, muitos deles infectados por *S. mansoni*, para as periferias dos grandes centros urbanos e para os pólos turísticos do litoral em busca de trabalho e sobrevivência. Ao longo dos anos, esse movimento migratório tem contribuído para favelização de comunidades, que passam a viver em locais sem saneamento e abastecimento de água. A consequência disso é a expansão da esquistossomose para áreas indenes do litoral e da região metropolitana do Recife, acarretando a urbanização da doença. Novos focos de transmissão se estabelecem em áreas litorâneas, onde o turismo é intenso, e onde tem havido sucessivos relatos de casos agudos da doença, como os registrados em Itamaracá, na Praia do Forte e Enseada dos Golfinhos, e Ipojuca, em Porto de Galinhas (BARBOSA, 1998; BARBOSA *et al.*, 2000, 2001a, 2001b, 2004).

O delineamento desse novo perfil epidemiológico nas áreas litorâneas do Estado tem criado uma demanda de profissionais de saúde com experiência não só no diagnóstico clínico da esquistossomose, mas também com familiaridade na administração do praziquantel a pacientes que nunca tiveram contato com *S. mansoni*. Vale lembrar que essa droga foi introduzida recentemente, em 1999, pelo Ministério da Saúde nas campanhas de controle e na rotina dos Postos de Saúde.

A existência de casos e/ou focos de transmissão em todos os municípios da Zona da Mata, e em quase todos os do Estado, a formação de novos focos em áreas litorâneas, o registro de altas prevalências em muitas localidades rurais e urbanas, bem como a estimativa da população sob risco de infecção são fortes argumentos para se afirmar que a esquistossomose ainda é um sério problema de Saúde Pública em Pernambuco.



### 1.3 AS FORMAS CLÍNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose mansônica é determinada pelo *S. mansoni* que se localiza nas vênulas do intestino grosso. De acordo com Domingues & Domingues (1994) a doença evolui de acordo com a idade do indivíduo na exposição inicial, a frequência das exposições e a intensidade da infecção, estabelecendo assim os quadros clínicos, que variam desde formas clínicas leves e assintomáticas, predominantes em áreas endêmicas, até as formas clínicas graves e limitantes da doença.

De acordo com Bina (1981), a infecção por *S. mansoni* ocasiona quatro formas clínicas: uma forma aguda e três formas crônicas (intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica).

A fase aguda é considerada mais severa, tendo sido descrita como Síndrome Toxêmica no Brasil ou como febre de Katayama, no Japão. Essa forma aguda se divide em duas fases: pré e pós-postural. A fase pré-postural é caracterizada por febre, dor-de-cabeça, mialgia, artralgia, urticária, dores abdominais, tosse, perda de peso, diarreia, edema e aumento do fígado. A fase pós-postural, coincide com a produção e maturação de ovos. O baço encontra-se aumentado e discretamente palpável, devido a hiperplasia linfóide intensa, congestão e espessamento dos cordões de Billroth associados à hiperplasia e infiltração de eosinófilos (NEVES, 1986; COUTINHO, DOMINGUES, 1993). Nessa fase, o quadro hematológico caracteriza-se por uma leucocitose moderada com intensa eosinofilia (REY, 2001). Essa fase clínica inicial afeta principalmente pessoas que nunca foram expostas aos antígenos do parasito, e tem sido descrita por vários autores como a “doença dos viajantes”, devido a freqüente ocorrência de visitantes em áreas endêmicas de países tropicais (RABELLO *et al.*, 1995; JESUS *et al.*, 2002, ROSS *et al.*, 2002). Nas regiões de área endêmica freqüentemente a fase aguda não é evidenciada (HUGGINS, SANTOS, 1994).

A fase crônica é a principal causa de morbidade em regiões endêmicas, sendo caracterizada por três formas clínicas. A forma intestinal possui sintomatologia variável, desde pequenos surtos diarreicos a desinteria, acompanhados de perda de apetite, cólicas intestinais, astenia, podendo apresentar lesões hepáticas discretas.

A forma hepatointestinal se caracteriza por lesões hepáticas mais extensas, acompanhadas da mesma sintomatologia da forma intestinal, porém mais acentuadas, e com fígado palpável. A diferença entre a forma intestinal e hepatointestinal é apenas de natureza quantitativa em relação às lesões hepáticas (DOMINGUES, DOMINGUES, 1994).

Na forma hepatosplênica, o quadro anatômico característico é a fibrose de Symmers e a esplenomegalia é mais acentuada que a hepatomegalia. Nesta fase, predominam as manifestações da hipertensão porta, tais como varizes esofagogástricas, circulação colateral abdominal, anemia e melena, decorrentes de hemorragias graves e muitas vezes fatais. Segundo Domingues e Domingues (1994) a forma hepatosplênica pode ser sub-dividida em duas fases: a fase compensada e a fase descompensada.

A fase compensada é caracterizada principalmente pela falta de insuficiência hepática, porém o fígado e o baço apresentam aumento de volume. Já a fase descompensada é caracterizada por hemorragias e insuficiência hepática grave (REY, 2001). Alguns pacientes podem permanecer com a forma clínica estacionária, outros podem vir a desenvolver fases mais graves ou descompensadas, isso dependerá do grau da infecção ou da associação com outros processos mórbidos.

A diferenciação entre as fases aguda e crônica da esquistossomose se baseia principalmente em dados clínicos e epidemiológicos associados com achados laboratoriais, obtidos através de testes sorológicos. Essa diferenciação é particularmente importante no que diz respeito ao procedimento adotado no tratamento dos portadores de infecção. No tratamento da esquistossomose aguda é recomendável a utilização de corticosteróides associados às drogas esquistossomicidas (praziquantel ou oxamniquine) a fim de reduzir as manifestações sistêmicas e alérgicas e suprimir a resposta imune causada tanto pelas formas imaturas quanto pelos vermes adultos do *S. mansoni* (LAMBERTUCCI *et al.*, 1989; RABELLO, 1997). Além disso, o tratamento precoce de casos agudos evita a evolução e o agravamento do quadro clínico (HUGGINS, SANTOS, 1994).

#### 1.4 Diagnóstico da esquistossomose

O diagnóstico de esquistossomose é feito fundamentalmente através de métodos parasitológicos. As técnicas de Hoffman, Pons e Janner (1934) e o de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972) são as mais utilizadas devido ao baixo custo e simplicidade. O método de Kato-Katz tem sido usado para o diagnóstico de *S. mansoni* em áreas endêmicas, devido à sua simplicidade, sensibilidade, acurácia e praticidade (RABELLO *et al.*, 1992; HLAING, 1993; RABELLO, 1997; GARCIA SANTOS *et al.*, 2000), e por permitir uma estimativa da carga parasitária do indivíduo infectado. Por essas razões, ele tem sido recomendado pela OMS como método diagnóstico de escolha e empregado pelo Ministério da Saúde nos inquéritos parasitológicos implementados nas comunidades endêmicas do país.

No entanto, a sensibilidade dos métodos parasitológicos, o que inclui o de Kato-Katz, diminui à medida que a prevalência e a intensidade da infecção são baixas. Portanto, eles se mostram inadequados para a realização de inquéritos parasitológicos tanto nas áreas de baixa endemicidade como naquelas submetidas a controle quimioterápico periódico. Nesses casos, é necessário o emprego de vários exames de um mesmo indivíduo para evitar a falha do método (BARRETO *et al.*, 1990; DE VLAS *et al.*, 1992; ENGELS *et al.*, 1996; SLEIGH *et al.*, 1982).

Outras situações que estão associadas com a redução ou ausência de ovos nas fezes e que também podem limitar a sensibilidade dos métodos parasitológicos são infecções recentes ou imaturas, infecções unissexuais, oviposição parasitária inconstante, e massa fecal com poucos ovos devido a fibrose da mucosa e submucosa intestinal (SLEIGH *et al.*, 1982; LIMA E COSTA *et al.*, 1984; TEESDALE *et al.*, 1985; DE VLAS *et al.*, 1992; VAN LISHOUT *et al.*, 1995; HAMILTON *et al.*, 1998; HOSHINO *et al.*, 2001).

O diagnóstico da esquistossomose também pode ser feito com base na detecção de anticorpos específicos, o que é particularmente importante nas situações em que o uso dos métodos parasitológicos não é adequado. Entretanto, grande parte desses testes imunológicos é de pouco valor diagnóstico devido a problemas de reações cruzadas com outras helmintoses, a não definição da intensidade da infecção, além de permanecerem positivos durante anos após a cura

parasitológica (SMITHERS, DOENHOFF, 1982; MONTENEGRO, 1992). Apesar da sorologia não ser capaz de distinguir infecção ativa e passada, o que pode ocasionar superestimativas do número de casos, ela teria menos chances de fornecer falsos-negativos que poderiam frustrar qualquer programa de controle (SMITHERS, DOENHOFF, 1982; MONTENEGRO, 1992).

Apesar da limitação dos testes sorológicos alguns países que apresentam esquistossomose intestinal e indivíduos eliminando menos de 100 ovos por gramas de fezes, têm adotado a sorologia como método de diagnóstico nos programas de controle para compensar as possíveis falhas dos métodos parasitológicos (NOYA *et al.*, 1998).

Porém, os métodos de detecção de anticorpos devem ser utilizados em situações específicas, pois oferecem baixa especificidade, persistência pós quimioterapia, reações cruzadas, baixa correlação com a produção de ovos, manuseio complexo e custos altos. Já os métodos de detecção de antígenos possuem vantagens como altas especificidades, correlação positiva com a sobrecarga parasitária e ainda a possibilidade de estimativa da intensidade da infecção, porém em áreas de baixa endemicidade não há vantagens sobre os métodos parasitológicos (RABELLO, ENK, 2007).

De acordo com Tsang *et al.*, (1983b) uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento de testes imunológicos é a escolha do antígeno apropriado para a detecção de anticorpos de uma infecção específica. Para que uma determinada substância seja empregada como antígeno em testes imunológicos é necessário que seja de fácil obtenção e em quantidades suficientes, se mantenha estável em condições de estocagem, contenha componentes antigênicos reconhecidos pela maioria dos anticorpos encontrados no soro de uma infecção específica, possua o mínimo possível de componentes que envolvam reações cruzadas e apresente compatibilidade com as técnicas sorológicas em uso.

Os antígenos empregados no imunodiagnóstico da esquistossomose podem ser obtidos de diversos estágios evolutivos do *S. mansoni*. Geralmente são escolhidos antígenos provenientes de vermes adultos e ovos, podendo ser proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos. Nos soros de indivíduos infectados

podemos encontrar diferentes isotipos de anticorpos: IgA, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM (BOCTOR, PETER, 1990).

A aplicação do imunodiagnóstico na esquistossomose teve início com Fairley em 1919, que utilizou um preparado de hepatopâncreas de caramujos infectados como antígeno em uma reação de fixação de complemento. Em 1927, Fairley e Williams utilizando o mesmo preparado antigênico desenvolveram um teste cutâneo. Posteriormente, outros pesquisadores ensaiaram diferentes testes para a detecção de anticorpos específicos ou de antígenos *in vitro*.

Em 1946, Brandt e Finch desenvolveram reações de floculação resultantes da formação de imunocomplexos com partículas antigênicas do parasito após a quarta semana de infecção.

A reação cercariana foi empregada por Vogel e Minning (1949), esta técnica utilizava cercárias vivas e os resultados mostraram que a sensibilidade variou de 100%, na fase aguda, até 6,1%, na fase crônica.

Já em 1950, Kagan e Olivier-Gonzales empregaram a reação de hemaglutinação indireta, que apresentou sensibilidade variando de 71 a 93% e especificidade de 88%. Hoshino *et al.*, (1970) também utilizaram essa reação, porém devido à inconstância na padronização dos reagentes e a ocorrência de reações cruzadas com outros tipos de infecção sua reprodutibilidade foi prejudicada.

Em 1954 Olivier-Gonzalez elaborou um ensaio no qual ocorria uma precipitação em torno dos ovos do parasito após 24h de reação a 37°C. Esta reação, denominada “reação periovular”, apresentou sensibilidade variando de 80 a 100%, sendo os valores mais altos encontrados na fase crônica da doença. Entretanto, as reações de precipitação têm como inconvenientes o longo tempo necessário para obtenção do resultado e a necessidade de ovos frescos e antígenos na forma viável.

Mais tarde, as reações de imunofluorescência indireta utilizando cercárias (SADUM *et al.*, 1960) e cortes do verme adulto como antígenos (COUDERT *et al.*, 1968; DEELDER *et al.*, 1989; KANAMURA *et al.*, 1979) foram desenvolvidas. A reação de imunofluorescência para a detecção de anticorpos IgM em corte de vermes adultos se mostrou prática, de baixo custo, bem sensível e específica no caso de infecções leves por *S. mansoni* (SILVA *et al.*, 1992). Além disso, Camargo-Neves *et al.*, (1998) confirmaram a praticidade dessa técnica em pesquisas

epidemiológicas, ao mostrar sua capacidade de detectar uma prevalência de sete a dez vezes maior que a observada pela técnica de Kato-Katz.

O radioimunoensaio também foi utilizado e figura como um dos métodos mais sensíveis para a análise quantitativa das reações antígeno/anticorpo e é importante no estudo das frações purificadas do *S. mansoni*, porém devido ao seu custo elevado, instabilidade dos reagentes e risco operacional, sua utilização é limitada (PELLEY *et al.*, 1977; HYLLIER *et al.*, 1979; NASH *et al.*, 1981; LONG *et al.*, 1981).

Lima e colaboradores (1993) utilizaram as reações de imunofluorescência e de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) para a detecção de anticorpos IgM anti-verme e de anticorpos IgG anti-ovo em pacientes com baixa carga parasitária e observaram que a reação de imunofluorescência apresentou maior sensibilidade, especificidade e valor preditivo em relação ao ELISA.

Ainda em 1997, Tsang e Wilkins utilizaram um ELISA adaptado, denominado de Fast-ELISA, com um antígeno microssomal de verme adulto (MAMA) que apresentou especificidade e sensibilidade de 99%.

Fluídos orais (saliva e transudato oral) foram avaliados através de ELISA anti-SEA (antígeno solúvel de ovo) para o diagnóstico da esquistossomose em área de endemicidade média no Brasil, como uma alternativa à coleta de sangue. A utilização do soro e do transudato oral no ELISA, mostraram sensibilidades de 98,8% e 100% e especificidades de 67,8% e 64,3% respectivamente. As vantagens deste teste estariam no fato de tratar-se de um método não invasivo e na diminuição de contágio por outras infecções (GARCIA SANTOS *et al.*, 2000).

A técnica de “Western Blot” foi primeiramente demonstrada por Tsang *et al.*, (1983a), na qual utilizaram diferentes preparações antigênicas do *S. mansoni* e amostras de soros de pacientes provenientes de áreas endêmicas distintas.

Ruppel *et al.*, (1985a) compararam pelo “Western Blot” perfis sorológicos de pacientes infectados por *S. mansoni* e pacientes infectados por outras parasitoses, utilizando extratos antigênicos dos parasitos. Eles observaram que todos os pacientes infectados por *S. mansoni* reagiram com um componente antigênico de 31 kDa do extrato e que não houve nenhuma reação nos soros dos pacientes infectados por outros vermes. Posteriormente, Ruppel *et al.*, (1985b) realizaram infecções experimentais em camundongos infectados com *S. mansoni*, e verificaram

que houve reações intensas em duas frações antigênicas, dependendo da fase da infecção. A fração de 31 kDa foi predominante na quarta semana e a fração de 67 kDa apareceu na sexta semana, mostrando claramente diferenciações na resposta imune no decurso da doença. Em 1987, Ruppel e colaboradores trabalharam com antígenos de *S. mansoni* e soros de pacientes infectados com *S. japonicum* e observaram que, houve reação cruzada entre as espécies de *Schistosoma*, já que todos os soros reconheceram as frações antigênicas 31/32 kDa.

Tsang e Wilkins (1991) utilizando o “Western Blot” mostraram reações específicas para as três principais espécies de *Schistosoma* com antígenos microssomais de verme adulto de *S. mansoni* (MAMA), de *S. japonicum* (JAMA) e *S. haematobium* (HAMA). Os soros de portadores da esquistossomose mansônica reconheceram uma glicoproteína de 30 kDa (GP30) no MAMA e não mostraram reatividade ao JAMA e ao HAMA. Os soros dos pacientes infectados com as outras duas espécies de *Schistosoma* não reconheceram a GP30. Somente os soros dos pacientes com esquistossomose japônica foram capazes de reconhecer três glicoproteínas de 18, 23 e 29 kDa. Já em relação ao antígeno HAMA, os autores observaram que apenas a glicoproteína de 23 kDa foi sempre reconhecida pelos soros de portadores de infecção pelo *S. haematobium*.

Sulahian *et al.*, (2005), avaliaram a performance da análise do “Western Blot” utilizando tiras disponíveis de antígenos comerciais e comparou os resultados com o teste de Hemaglutinação Indireta (HI) e Imunofluorescência Indireta (IFI) no sorodiagnóstico da esquistossomose humana e observaram que o total das sensibilidades e especificidades dos grupos de pacientes infectados com *S. mansoni* e *S. haematobium* foram 89,5% e 100%, respectivamente, com valores preditivos positivo e negativo de 100 e 91,3%, respectivamente. De acordo com os autores, a análise do “Western Blot” se mostrou uma técnica útil no diagnóstico imunológico da esquistossomose.

Oliveira *et al.*, (2005) utilizaram IgM-ELISA como método para detecção de anticorpos IgM contra a fração de antígenos de vermes adultos de *S. mansoni* (AWA) solúvel em ácido tricloroacético (AWA-TCA), aplicado em 3 grupos de indivíduos com diferentes características clínicas e epidemiológicas. Esses resultados foram comparados com os obtidos por outros métodos de imunodiagnósticos (teste de imunofluorescência para detecção de anticorpos IgM -

IgM-IFI ou anticorpos IgG - IgG-IFI, ELISA para detecção de anticorpos de IgG - IgG-ELISA) e de diagnóstico parasitológico (Kato-Katz e avaliação da viabilidade dos ovos). O teste IgM-ELISA apresentou 98% de sensibilidade, quando o método parasitológico de fezes é definido como teste referência, e especificidade de 98% e 97,3%, para o grupo de indivíduos clinicamente saudáveis e portadores de outros helmintos, respectivamente. A eficácia do diagnóstico foi de 97,8% em pacientes de baixa carga parasitária, sugerindo que este método poderá ser utilizado em áreas de baixa endemicidade.

Muitos estudos têm sido feitos na tentativa de obter antígenos purificados e/ou marcadores de fases clínicas da doença, já que isso resultaria em diagnósticos mais sensíveis e específicos. Dentre os mais estudados e com potencial para uso em imunodiagnóstico encontra-se a fração Sm31/32, descrita primeiramente por Ruppel *et al.*, (1985a). Técnicas imunohistoquímicas mostraram que os antígenos presentes nessa fração são dois polipeptídeos oriundos do tubo digestivo do verme, hábeis indutores de forte e precoce resposta humoral. A tecnologia do DNA recombinante tem viabilizado a produção purificada da fração Sm31/32 em grandes quantidades. Porém, ainda não se obteve uma padronização satisfatória destes testes utilizando-se esses antígenos (VALLI, 2001).

Noya *et al.*, (2001) baseados na seqüência do Sm31, sintetizaram 17 peptídeos, dos quais dez se mostraram altamente imunogênicos em experimentos animais. Os anticorpos gerados por esses peptídeos reconheceram moléculas de *S. mansoni* em "Western Blot" e em cortes de tecidos do parasita. Com isso, concluíram que o Sm31 poderia ser utilizado na produção de anticorpos monoclonais ou policlonais para detecção de antígenos circulantes, contribuindo para o desenvolvimento de métodos novos, específicos e sensíveis para o diagnóstico.

Outros antígenos recombinantes avaliados são a P28 glutionina S-transferase, a proteína de 70kDa, a tropomiosina e as catepsinas B e L do *S. mansoni* (HAMILTON *et al.*, 1998). Segundo o autor, as dificuldades na obtenção de peptídeos ou proteínas recombinantes estão relacionadas à sua produção em sistemas microbiais que possibilitam configurações distintas da molécula nativa, à falha desse sistema em fornecer moléculas glicosiladas e, algumas vezes, à separação incompleta do produto expresso de outros constituintes do sistema de



expressão. Tais problemas, enquanto não solucionados, são passíveis de tornarem o antígeno recombinante pouco imunogênico e menos específico.

Sandoval *et al.*, (2006) desenvolveram uma nova abordagem diagnóstica baseada na detecção de DNA do *S. haematobium* pelo PCR (“Polymerase Chain Reaction”) na urina. Esse autor adaptou essa abordagem em um modelo experimental murino para *S. mansoni* acompanhando os estágios agudo e crônico da infecção, comparando com duas ferramentas diagnóstica freqüentemente utilizadas no diagnóstico da esquistossomose (Kato-Katz e ELISA) e com o PCR em amostras de fezes. Os resultados sugerem que esta nova abordagem de PCR pode ser utilizada também na detecção da esquistossomose aguda por *S. mansoni* utilizando a urina, sendo mais sensível do que os métodos tradicionais (Kato-Katz e ELISA).

Suzuki *et al.*, (2006) desenvolveu e avaliou um novo tipo de PCR para detecção de DNA de *S. mansoni* em amostras de soro de camundongos como diagnóstico potencial para detecção da esquistossomose. Amostras de soro foram testadas diretamente, sem a necessidade de extração do DNA. Nenhuma reação cruzada entre *S. mansoni* e outras espécies de helmintos testadas foi observada. Após a infecção, o soro e as fezes dos camundongos foram coletadas por 8 semanas. Anticorpos IgG anti-verme adulto e anti-ovo foram detectados no soro após 6 semanas de infecção pelo ELISA e os ovos do parasita só foram detectados nas fezes após 8 semanas. Por outro lado, o DNA de *S. mansoni* foi detectado no soro com 2 semanas após infecção, sugerindo que o PCR é uma potencial ferramenta para diagnóstico da infecção recente de *S. mansoni*.

A maioria dos testes sorológicos para discriminação da esquistossomose aguda e crônica utiliza as técnicas de imunofluorescência, ELISA, ou “Western Blot”. O emprego da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em cortes de vermes adultos permitiu observar anticorpos IgA na fase aguda da doença, e IgM e IgG tanto na fase aguda quanto na crônica. Portanto, no estágio crônico a IgA desaparece, mas tanto IgM e IgG se mantêm presentes. Porém, o padrão de fluorescência de IgG se torna difuso e IgM sofre uma redução de seus títulos em quase dez vezes (KANAMURA *et al.*, 1979, 1991). Esse padrão de detecção dos anticorpos IgA, IgM e IgG, revelados pela imunofluorescência indireta, também foi confirmado nos ensaios imunoenzimáticos (KANAMURA *et al.*, 1979; MOTT & DIXON, 1982; LIMA

*et al.*, 1996), nos quais a IgA aparece como marcador da fase aguda (três meses) e a IgM e/ou IgG como marcadores da fase crônica.

A técnica de ELISA é um dos testes mais utilizados para analisar a resposta sorológica específica contra antígenos de *Schistosoma* na tentativa de discriminar as formas clínicas da doença nos países onde a doença é endêmica. Valli *et al.*, (1997) avaliaram a eficiência do ELISA no diagnóstico e na distinção sorológica das duas fases da infecção. Nesse estudo, foram detectados anticorpos IgG contra antígenos do verme em todos os pacientes (100%). Anticorpos IgA foram detectados em 81,8% dos pacientes em fase aguda e 5,9% daqueles na fase crônica da doença. Esses resultados demonstraram que o ELISA, utilizando extratos solúveis de vermes adultos, apresentaram excelente sensibilidade e especificidade, além de distinguir o isotipo predominante e a fase da doença.

Valli *et al.*, (1999) também utilizaram a técnica de “Western Blot” e o antígeno solúvel de *S. mansoni* adulto em um estudo com pacientes esquistossomóticos em diferentes fases da doença (aguda e crônica) e crianças com altos títulos de IgM. A fração 31/32 kDa foi a mais reconhecida pelos diferentes isotipos de anticorpos. Em pacientes de fase aguda, seu reconhecimento pelos anticorpos IgG e IgM chegou a 100%, e por IgA a 90%. Em 98% dos portadores da fase crônica, a fração 31/32 kDa foi reconhecida pelo anticorpo IgG e apenas 10% dos pacientes produziram anticorpos IgA e IgM. O perfil dos soros das crianças foi semelhante aos pacientes em fase aguda. Essas observações confirmam a fração 31/32 kDa como um marcador sorológico de fase aguda e também a possibilidade de diferenciação das fases de infecção a partir do isotipo selecionado para o diagnóstico.

Antígenos como SEA – “Soluble Egg Antigen” (LIPPING *et al.*, 1996) e SWAP – “Soluble Worm Antigen Preparation” (VALLI *et al.*, 1997) também são utilizados para diferenciação das formas clínicas através da detecção de níveis de anticorpos IgM, IgG e IgA contra esses antígenos. Além disso, o antígeno recombinante Sm14, que é extraído de vermes adultos de *S. mansoni* (TENDLER *et al.*, 1996), também pode ser de utilidade diagnóstica para diferenciar formas agudas e crônicas.

Segundo estudos de Omer Ali *et al.*, (1989), na esquistossomose ocorre uma resposta imune contra antígenos de superfície do esquistossômulo recém-formado com altos níveis de anticorpos direcionados a epítomos de carboidratos que são

detectados somente durante a fase aguda da doença. A presença de uma hemocianina (“Keyhole Limpet Haemocyanin” - KLH) encontrada no molusco marinho *Megathura crenulata*, que compartilha um epítopo bem definido com a superfície do esquistossômulo (GRZYCH *et al.*, 1987), pode contribuir para elaboração de um imunodiagnóstico simples capaz de diferenciar as formas clínicas da esquistossomose.

Essa abordagem diagnóstica avaliando a atividade de anticorpos IgG e IgM anti-KLH foi utilizada não só como mais um recurso potencial para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* no Brasil (ALVES BRITO *et al.*, 1992), *S. mansoni* e *S. haematobium* no Egito (MARKL *et al.*, 1991) e *S. japonicum* na China (YUESHENG *et al.*, 1994), mas também para diferenciação das infecções esquistossomóticas aguda e crônica, bem como para monitorar a cura quimioterápica (MANSOUR *et al.*, 1989; RABELLO *et al.*, 1993, 1995; RABELLO, 1997). Sobre esse tema, Rabello *et al.*, (1995) demonstraram que tanto os níveis de IgM quanto de IgG anti-KLH foram mais significativamente altos no grupo de pacientes com a forma aguda do que nos crônicos. Os títulos de IgA anti-SEA também se mostraram estatisticamente mais altos nos pacientes com a forma aguda. A sensibilidade do IgM e do IgG anti-KLH e do IgA anti-SEA para a detecção da forma aguda da infecção foram 94,4 e 100%, respectivamente. Os autores confirmam a utilização do KLH como um marcador diagnóstico devido a sua alta sensibilidade, e sugerem a utilização do IgA anti-SEA como uma nova ferramenta para a diferenciação sorológica das formas aguda e crônica da esquistossomose humana.

Além disso, os anticorpos que reagem contra o antígeno solúvel de ovo (SEA) e contra o KLH, vêm sendo usados na verificação de cura após dois anos da quimioterapia. A IgM anti-KLH torna-se negativa após 2 meses do tratamento e a IgG anti-KLH declina cerca de 12 a 24 meses depois. Tanto a IgM quanto a IgG contra antígenos de ovo e do verme adulto permanecem reativas durante o mesmo período. Entretanto, alguns trabalhos não confirmam as qualidades do KLH como marcador de fase aguda, de qualquer forma, o diagnóstico específico da esquistossomose não seria obtido com esse antígeno (HAMILTON *et al.*, 1998).

## 2. JUSTIFICATIVA

A diferenciação entre as formas aguda e crônica da esquistossomose se baseia em dados clínicos e epidemiológicos associados com achados laboratoriais que são obtidos através de testes sorológicos. Essa diferenciação é particularmente importante no que diz respeito ao procedimento adotado no tratamento dos portadores de infecção. Na esquistossomose aguda é recomendável a utilização de corticosteróides associados às drogas esquistossomicidas (praziquantel ou oxamniquine) a fim de reduzir as manifestações sistêmicas e alérgicas e suprimir a resposta imune causada tanto pelas formas imaturas quanto pelos vermes adultos do *S. mansoni* (LAMBERTUCCI *et al.*, 1989, RABELLO *et al.*, 1994). Além disso, o tratamento precoce de casos agudos evita a evolução e o agravamento do quadro clínico (BINA 1981, 1992; PRATA 1976, 2004; ANDRADE, AZEVEDO 1987, 1989; HUGGINS, SANTOS 1994; DOMINGUES, DOMINGUES 1994).

Numerosas técnicas têm sido utilizadas para o sorodiagnóstico da esquistossomose, entretanto, há divergências referentes à adequação dos métodos capazes de distinguir entre as formas aguda e crônica da doença. O desenvolvimento e/ou validação de uma ferramenta que permita o diagnóstico diferencial das formas clínicas seriam de extrema importância para os serviços de saúde de Pernambuco não só para fins de inquéritos populacionais em áreas de baixa prevalência e intensidade de infecção e/ou submetidas a ações interventivas de controle, mas também na definição de medidas terapêuticas frente aos casos agudos de infecção frequentemente registrados nas áreas litorâneas. No ponto de vista do diagnóstico individual estes testes podem ser úteis para definir casos com história epidemiológica e manifestações clínicas duvidosas, permitindo com isso o tratamento precoce do indivíduo, evitando que o mesmo desenvolva a forma crônica da doença que é potencialmente grave.

### 3. PERGUNTA CONDUTORA

Os testes imunológicos utilizando os antígenos KLH, SEA, SWAP e Sm14, são capazes de diferenciar as formas clínicas, aguda e crônica, da esquistossomose mansônica?

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GERAIS:

- Reavaliar os testes sorológicos utilizando os antígenos KLH, SEA e SWAP para a distinção das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica humana;
- Avaliar o antígeno recombinante Sm14 para a distinção das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica humana.

### 4.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar a resposta humoral de pacientes com as formas clínicas aguda e crônica da esquistossomose, analisando a reatividade de anticorpos IgG, IgM e IgA contra antígenos KLH, SEA, SWAP e o antígeno recombinante Sm14;
- Avaliar a resposta humoral de pacientes infectados com *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e Ancilostomídeos, analisando a reatividade dos mesmos anticorpos e antígenos utilizados para os pacientes com esquistossomose;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes utilizados;
- Analisar estatisticamente as diferenças entre níveis de anticorpos relacionados às formas clínica aguda e crônica.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 SELEÇÃO DE SUJEITOS

Os indivíduos esquistossomóticos, portadores de outras helmintoses e os normais foram selecionados, em três municípios: Recife, São Lourenço da Mata e Ipojuca, pertencentes à Região Metropolitana do Recife (Figura 3). A seleção para a caracterização tanto dos pacientes esquistossomóticos agudos e crônicos quanto os portadores de outras helmintoses, utilizou os seguintes critérios: participação em inquérito epidemiológico, história clínica, exames físico e parasitológico de fezes. Já os critérios utilizados para a seleção dos indivíduos normais foi o inquérito epidemiológico e o exame parasitológico de fezes. Os métodos parasitológicos empregados para confirmação da doença ativa foram o de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972) e o de Hoffman, Pons e Janer (1934).

Foram dois os tipos de estudos utilizados neste trabalho. Os estudos foram definidos como estudo de observacional que foi utilizado na seleção dos grupos de pacientes esquistossomóticos crônicos e os pacientes portadores de outras helmintoses. O segundo estudo foi definido como estudo transversal onde houve a caracterização dos pacientes com a forma aguda da esquistossomose e os indivíduos sem a doença.

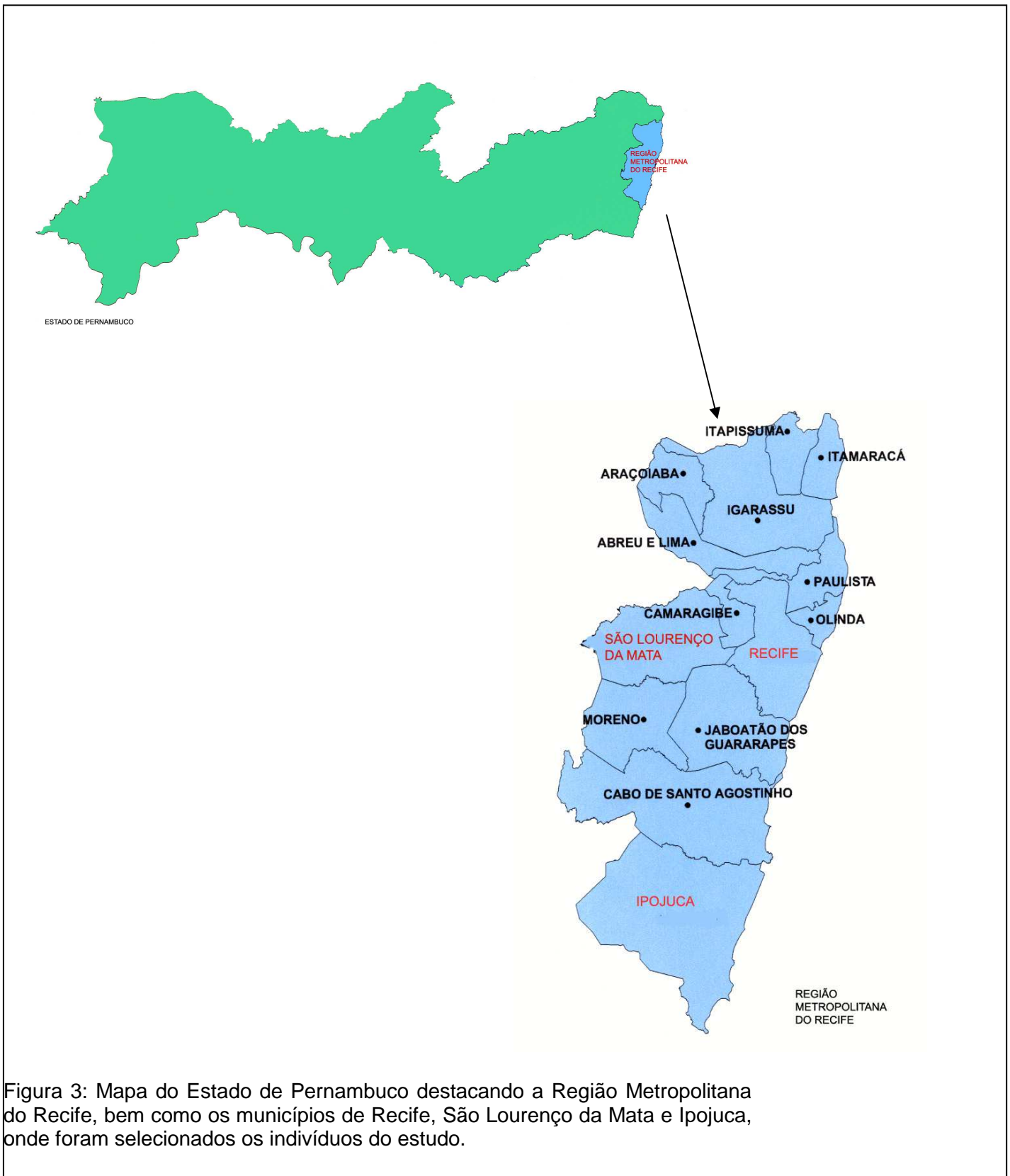


Figura 3: Mapa do Estado de Pernambuco destacando a Região Metropolitana do Recife, bem como os municípios de Recife, São Lourenço da Mata e Ipojuca, onde foram selecionados os indivíduos do estudo.



O grupo de pacientes portadores da esquistossomose aguda (n = 54) foi selecionado de um surto epidemiológico da doença ocorrido, em 2000, em Porto de Galinhas, no município de Ipojuca (Figura 4), Pernambuco (BARBOSA *et al.*, 2001a, 2001b). Essa seleção foi feita com base em exames clínico, hematológico e parasitológico de fezes (03 amostras). O exame clínico foi realizado em colaboração com uma equipe de médicos, pertencentes ao Setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. As manifestações clínicas predominantes foram: mal-estar, febre alta, emagrecimento, fenômenos alérgicos, tosse, diarreia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia. Os exames laboratoriais hematológicos apresentaram leucocitose com eosinofilia e altos níveis de IgE total e nos parasitológicos foram observados ovos de *S. mansoni* através dos métodos de Hoffman, Pons e Janer (1934) e de Kato-Katz (1972), caracterizando a forma ativa da doença. Após o tratamento quimioterápico dos pacientes com oxamniquine (15 mg/kg) houve redução da leucocitose, da eosinofilia e dos níveis de IgE.

Esse grupo foi formado por 24 indivíduos do sexo feminino (44,4%) e 30 indivíduos do sexo masculino (55,5%), incluindo crianças e adultos com idades variando de 3 a 47 anos. A carga parasitária média para o grupo de pacientes agudos foi de 157,8 ovos por grama de fezes (opg), correspondendo a apenas um exame Kato-Katz, realizado no ano de 2000, cujo resultado foi a média da leitura de duas lâminas.



Figura 4: Áreas residenciais alagadas em Porto de Galinhas, município de Ipojuca, Pernambuco, após fortes chuvas ocorridas durante o mês de julho de 2000.

O grupo de pacientes com esquistossomose crônica (n = 54) foi selecionado de um estudo observacional formado por indivíduos que, durante o período de 1995 a 1999, participaram de três inquéritos parasitológicos anuais, realizados no Engenho Araújo (Figura 5), município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, considerado endêmico para a doença (Beck *et al.*, 2001). Dos pacientes pertencentes ao grupo dos esquistossomóticos crônicos, 53 pacientes possuíam a forma clínica intestinal e um possuía a forma hepatointestinal.

Em cada inquérito, três amostras de fezes foram coletadas de cada indivíduo, a intervalos semanais, com duas lâminas cada, totalizando o exame de seis lâminas por indivíduo por inquérito. Foram considerados positivos os indivíduos com opg > 0 em pelo menos uma das seis lâminas Kato-Katz e negativos, os que não apresentaram ovos nas seis lâminas. O nome, idade, peso e eventuais contra-indicações para o tratamento de cada paciente foram registrados em formulário padrão. O tratamento seletivo com oxaminiquine (até 1998) ou praziquantel (em 1999) foi administrado anualmente, sempre após o primeiro inquérito (março), seguindo as recomendações de dosagens e contra-indicações da FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/FUNASA (FNS, 1994). Após o inquérito de março de 1999, antes da introdução do praziquantel, o sangue dos 54 pacientes crônicos, com diagnóstico positivo para *S. mansoni*, foi coletado para obtenção do plasma. Após o tratamento com o praziquantel os pacientes foram acompanhados até setembro/2003.

O grupo de pacientes com esquistossomose crônica foi formado por 31 indivíduos do sexo feminino (57,4%) e 23 indivíduos do sexo masculino (42,6%), e incluiu crianças e adultos com idades variando de 4 a 79 anos. A carga parasitária média para este grupo foi de 181,44 ovos por grama de fezes (opg).



Figura 5: Áreas do Engenho Araújo, município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, mostrando o detalhe das residências e do riacho, utilizado pela população local para várias atividades domésticas e de lazer.

O grupo de pacientes portadores de outras helmintoses foi composto por nove indivíduos infectados com *Ascaris lumbricoides*, *Tricuris trichiura* e ancilostomídeos, residentes no mesmo engenho onde foram selecionados os pacientes crônicos. O sangue deles também foi coletado antes da medicação com mebendazol, logo após o inquérito parasitológico de março de 1999. Esse grupo foi formado por cinco indivíduos do sexo feminino (55,5%) e quatro indivíduos do sexo masculino (44,4%), com idades variando de 8 a 79 anos. Dos nove pacientes, cinco (55,5%) possuíam infecção dupla, por *A. lumbricoides* e *T. trichiura* ou ancilostomídeos e *T. trichiura*. No restante da amostra (n=4) foram encontradas infecções simples por *T. trichiura* ou por ancilostomídeos. Não foi observada a presença de ovos de *S. mansoni* em nenhum dos pacientes deste grupo.

O grupo de indivíduos normais (n = 15), foi composto por 12 indivíduos do sexo feminino (80%) e três indivíduos do sexo masculino (20%), com idades variando de 22 a 50 anos, cujo diagnóstico parasitológico de fezes foi negativo para *S. mansoni* em duas amostras de fezes, cada um com duas lâminas, totalizando quatro lâminas Kato-Katz. Os indivíduos desse grupo residiam no município de Recife e nenhum deles relatou ter contato com banhos de rios, lagos ou riachos.

## 5.2 OBTENÇÃO DO PLASMA

O sangue (5 ml) de pacientes com as formas aguda e crônica, o dos indivíduos portadores de outras helmintíases, assim como o dos indivíduos normais foram coletados com heparina (10 U/ml). Em seguida ele foi centrifugado e os plasmas separados. Após a separação, o plasma de todos os indivíduos foi mantido à temperatura de -20°C até serem utilizados nos testes imunológicos.

### 5.3 Antígenos utilizados

Os seguintes antígenos de *S. mansoni* foram utilizados no presente estudo:

- **SEA:** utilizado na concentração de 10 µg/ml para detecção de IgG e IgM e 87,5 µg/ml para detecção de anticorpos IgA.
- **SWAP:** utilizado na concentração de 10 µg/ml para detecção de IgG e IgM.
- **Sm14:** utilizado na concentração de 10 µg/ml para detecção de IgG e 5 µg/ml para a detecção de IgA.
- **KLH:** utilizado na concentração de 2µg/ml para detecção dos anticorpos IgG e IgM.

O antígeno SEA foi obtido de acordo com a metodologia proposta por Pearce *et al.*, (1991), a quantidade da proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951), e as alíquotas foram liofilizadas e estocadas em pequenas quantidades à -70°C. O SWAP foi preparado de acordo com a metodologia de Boros e Warren (1970). O antígeno recombinante Sm 14 foi produzido, segundo Tendler *et al.*, (1996) e fornecido pelo Laboratório de Esquistossomose Experimental do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. O antígeno KLH foi obtido comercialmente (H-7117, Sigma).

As concentrações ideais dos antígenos foram determinadas após titulação prévia, utilizando-se um plasma padrão positivo e outro negativo.

#### 5.4 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELISA

O teste utilizado para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA contra os antígenos acima mencionados foi o ELISA indireto. Para sua realização foram usadas placas do tipo Immulon 4 com 96 poços. Essas placas foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em tampão carbonato/bicarbonato, 0,01M, pH 9,6 nas concentrações descritas acima e incubadas por 18 h a 4°C. Após essa etapa, as placas foram bloqueadas com 150 µl de leite instantâneo desnatado a 5% em PBS Tween 20 (salina tamponada com fosfato - polyoxyethylene sorbitan monolaurate) a 0,05%, pH 7,6 durante 1 h a 37°C para as placas sensibilizadas com KLH e por 45 min a 37°C para as placas sensibilizadas com SEA, SWAP e Sm14. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 a 0,05%, pH 7,2.

Os plasmas dos pacientes agudos e crônicos, dos indivíduos normais e do controle positivo foram diluídos em PBS Tween 20 a 0,05%, pH 7,6 e adicionados às placas em um volume de 50 µl por poço, em duplicata, nas seguintes proporções e nas condições de incubação descritas abaixo:

- 1:2000 para detecção de anticorpos IgM e IgG contra o antígeno KLH e incubadas por 2 h em temperatura ambiente;
- 1:400 para detecção de IgM e 1:200 para detecção dos anticorpos IgG e IgA contra o antígeno SEA e incubadas por 45 min a 37°C;
- 1:100 para detecção de anticorpos IgM e IgG contra o antígeno SWAP e incubadas por 45 min a 37°C.
- 1:100, para a detecção de IgG e 1:50 para detecção de IgA contra o antígeno recombinante Sm14 e incubadas por 30 min a 37°C.

Dois poços da placa com os respectivos antígenos e com 50 µl de PBS Tween 20 a 0,05%, pH 7,6 em lugar do soro foram utilizados em cada placa para caracterizar o branco da reação. As placas foram novamente lavadas três vezes com PBS Tween 20 a 0,05%, pH 7,2.

Após as lavagens, os conjugados (anti-imunoglobulina humana dos isotipos IgM, IgG ou IgA) marcados com peroxidase foram colocados em um volume de 50 µl



por poço, diluídos em PBS Tween 20 0,05%, pH 7,6 nas proporções e condições de incubação abaixo:

- 1:1000 para detectar anticorpos IgM e IgG contra o antígeno KLH e incubadas por 2 h em temperatura ambiente;
- 1: 2.500, 1: 3.000 e 1:700 para detectar anticorpos IgM, IgG e IgA contra o antígeno SEA respectivamente e foram incubadas por 45 min a 37°C.
- 1:750 para detectar anticorpos IgM e 1:1500 para IgG contra o antígeno SWAP e incubadas a 45 min a 37°C.
- 1:3.000, 1:750 para detectar anticorpos IgG e IgA contra o antígeno recombinante Sm14 e incubadas a 45 min a 37°C.

Após essa etapa, mais três lavagens foram realizadas. Em seguida, foi aplicado o substrato ABTS (2,2'-azino-di[3-ethylbenzothiazoline sulfonate (6)]) em um volume de 100 µl por poço e incubado a temperatura ambiente e no escuro para IgG por cerca de 20 min e por 30 min sob as mesmas condições para IgM e IgA. Decorrido esse tempo, a revelação foi interrompida utilizando SDS ("Sodium Dodecyl Sulfate") a 10% e as placas foram analisadas utilizando o software "Microplate Manager" em um computador conectado ao leitor de ELISA "Microplate Reader" modelo 3550 BioRad, em comprimento de onda de 405 nm.

As diluições ideais de soro e de conjugado foram determinadas após titulação prévia, utilizando-se um plasma padrão positivo e outro negativo.

Os níveis de anticorpos encontrados foram expressos sob a forma de UAE (unidade arbitrária de ELISA) a fim de minimizar a variabilidade de valores dos controles positivo e negativo bem como das amostras encontradas em cada experimento (VERWEIJ *et al.*, 1995). A UAE consiste na razão entre a densidade ótica (D.O.) encontrada para cada amostra teste e a D.O. encontrada para o plasma referência na mesma placa.

### 5.5 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados vários parâmetros para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, são eles:

- Curva ROC (“Receiver Operating Characteristics”) – utilizada para mostrar o equilíbrio entre a sensibilidade e especificidade de um teste, mostrando o melhor ponto de corte (FLETCHER *et al.*,1996);
- “Cut-Off” (CO) – indica um valor acima do qual os resultados são considerados positivos e indicam os doentes e abaixo, os resultados são dados como negativos e correspondem aos não doentes (FERREIRA, ÁVILA, 2001);
- Sensibilidade – proporção dos indivíduos com a doença, com teste positivo (FERREIRA, ÁVILA, 2001);
- Especificidade – proporção dos indivíduos sem a doença, com teste negativo (FERREIRA, ÁVILA, 2001);
- “Likelihood Ratio” ou razão de Probabilidade (LR) – indica a probabilidade de tal resultado em pessoas com a doença, dividida pela probabilidade do mesmo resultado em pessoas sem a doença. Expressando, quantas vezes mais (ou menos) é provável encontrar um resultado de um teste em pessoas doentes comparadas com as não doentes (FLETCHER *et al.*,1996).

Os resultados foram analisados através do software estatístico “Medcalc” Versão 8.1 para análise da curva ROC e para traçar e determinar o CO. Os gráficos da curva ROC mostram a sensibilidade versus 1 - especificidade, de modo que as áreas geradas abaixo da curva (AACs) variem de 0,5 a 1,0 com valores mais altos indicando o aumento da capacidade discriminatória. Quando a variável sob estudo não pode ser distinguida entre os dois grupos, a área será igual a 0,5 (a curva ROC irá coincidir com a diagonal). O CO foi selecionado para produzir maior acurácia (mínimo de resultados falsos negativos e falsos positivos).

A comparação das AACs foram representadas utilizando pressupostos não paramétricos. A sensibilidade, a especificidade e a LR para os resultados encontrados foram calculadas, como descrito por Sackett *et al.*, (1991). As taxas de probabilidade expressaram as “Odds Ratio” (OR) para um soro referência. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 5.6 Aspectos éticos

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), processo nº 02/2003 (Anexo 1).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM A FASE AGUDA E CRÔNICA DA ESQUISTOSSOMOSE

De acordo com os resultados encontrados, o SEA IgA, SEA IgG, SEA IgM, SWAP IgG, KLH IgM, e KLH IgG apresentaram áreas na curva ROC com valores significativamente diferentes de 0,5. Estes resultados indicaram que os testes imunológicos utilizados possuem capacidade de distinguir os grupos dos pacientes com a forma aguda daqueles com a forma crônica da esquistossomose mansônica. Já o Sm14 IgA, Sm14 IgG e o SWAP IgM apresentaram áreas abaixo da curva ROC, porém com valores que não diferiram significativamente de 0,5 ( $p > 0,05$ ), indicando que estes testes imunológicos utilizando o Sm14 não possuem capacidade discriminatória para distinguir as fases da doença.

O teste que mostrou uma maior capacidade discriminatória entre as formas clínicas aguda e crônica foi o SEA IgA (AAC = 0,877). Além disso, esse teste também mostrou uma AAC significativamente maior quando comparado com o SEA IgG ( $p = 0,012$ ), com o SEA IgM ( $p < 0,001$ ) e com o SWAP IgG ( $p = 0,005$ ). Entretanto, as diferenças nas AACs não foram estatisticamente significativas em relação ao KLH IgM e o KLH IgG (AACs de 0,825 e 0,793, respectivamente), apesar de também apresentarem AACs altas (Tabela 1, Figura 6).

Semelhantemente, o SEA IgA e o KLH IgM também apresentaram AACs relativamente altas. Apesar disso, as áreas não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) quando comparadas ao SEA IgG, o SEA IgM, o SWAP IgG, o KLH IgM e o KLH IgG. As diferenças observadas entre as AACs do SEA IgG, o KLH IgG, o SWAP IgG e o SEA IgM não foram significativas, indicando capacidades discriminatórias das formas clínicas aguda e crônica semelhantes entre si (Tabela 1 e Figura 6).

O CO foi calculado para a obtenção dos melhores resultados entre a sensibilidade e a especificidade. Os resultados das sensibilidades, das especificidades e das taxas de probabilidade (LR+: "Likelihood Ratio" para resultados positivos; LR-: "Likelihood Ratio" para resultados negativos) dos vários testes estudados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação das formas aguda e crônica da esquistossomose\*.

Testes	AAC (IC 95%)	CO	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-
SEA IgA	0,877 (0,800-0,932)	0,054	80,0 (67,0-89,6)	87,0 (75,1-94,6)	6,17	0,23
KLH IgM	0,825 (0,741-0,891)	0,041	80,0 (67,0-89,6)	75,9 (62,4-86,5)	3,32	0,26
KLH IgG	0,793 (0,645-0,818)	0,059	74,5 (61,0-85,3)	75,9 (62,4-86,5)	3,10	0,34
SEA IgG	0,738 (0,704-0,864)	0,641	70,9 (57,1-82,4)	68,5 (54,4-80,5)	2,25	0,42
SWAP IgG	0,712 (0,617-0,795)	0,962	63,0 (48,7-75,7)	70,4 (56,4-82,0)	2,12	0,53
SEA IgM	0,669 (0,572-0,756)	0,098	61,8 (47,7-74,6)	64,8 (50,6-77,3)	1,76	0,59

\* Foram apresentados apenas os testes que diferenciaram as duas formas clínicas.

AAC: área abaixo da curva ROC; IC: Intervalo de confiança; LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos; LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos; e CO: valores acima dos quais são considerados positivos.

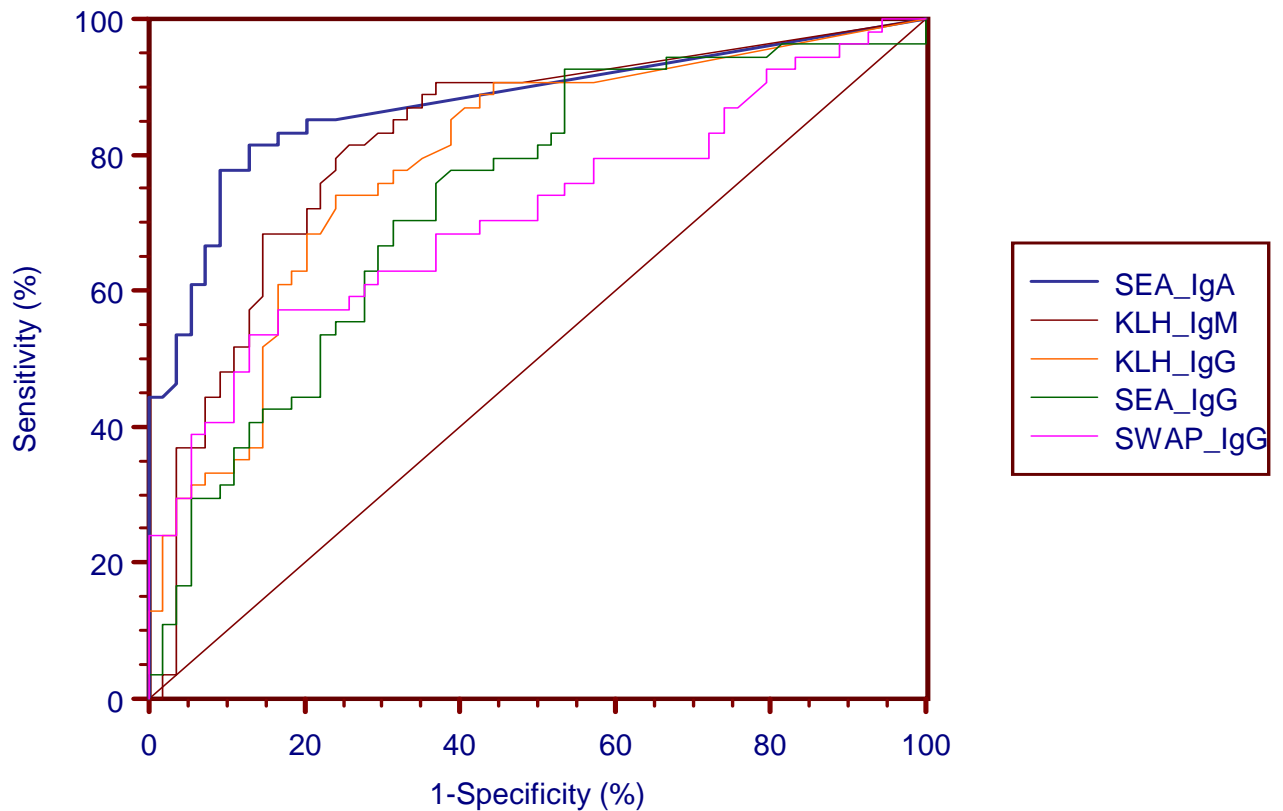


Figura 6: A curva ROC mostra a capacidade de alguns testes estudados discriminarem as fases aguda e crônica da esquistossomose. As áreas acima da curva indicam as melhores discriminações totais dos testes.

## 6.2 DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM A FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE COMPARADOS A INDIVÍDUOS SEM ESQUISTOSSOMOSE E PACIENTES INFECTADOS COM OUTRAS HELMINTOSES

Os resultados mostraram que tanto o SWAP IgG (AAC = 0,958), quanto o SEA IgG (AAC = 0,847) e o KLH IgM (AAC = 0,655), apresentaram áreas da Curva ROC significativamente diferentes de 0,5 ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0438$ , respectivamente), indicando que os testes utilizados possuem capacidade discriminatória entre o grupo de pacientes com a forma aguda da doença e o grupo de pacientes sem esquistossomose, incluindo nesse grupo aqueles indivíduos portadores de outras helmintoses (Tabela 2).

O SWAP IgG mostrou a maior taxa de AAC, o que demonstra uma capacidade discriminatória entre os pacientes portadores da esquistossomose e pacientes portadores de outras helmintoses. Além disso, foi encontrada uma taxa significativamente mais alta de AAC para o SWAP IgG quando comparada tanto com o SEA IgG ( $p = 0,026$ ) e com o KLH IgM ( $p < 0,001$ ). A AAC demonstrada pelo SEA IgG foi mais alta do que a apresentada pelo KLH IgM ( $p = 0,018$ ), indicando um alto poder discriminatório. Por outro lado, pacientes portadores da forma aguda da doença não produzem quantidade suficiente de anticorpos específicos nos outros testes estudados (SEA IgM, SEA IgA, SWAP IgM, Sm14 IgA, Sm14 IgM e KLH IgG), apresentando AAC não diferente de 0,5 ( $p > 0,05$ ), indicando que estes testes não têm capacidade discriminatória entres os grupos comparados (Tabela 2).



Tabela 2: Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação de pacientes com infecção aguda e de pacientes sem esquistossomose, incluindo pacientes infectados com outras helmintoses\*.

Testes	AAC (IC 95%)	CO	Sensibilidade (IC 95% )	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-
SWAP IgG	0.958 (0.879- 0.991)	0.427	87.0 (75.1-94.6)	85.7 (57.2-97.8)	6.09	0.15
SEA IgG	0.847 (0.740- 0.922)	0.55	85.5 (73.3-93.5)	78.6 (49.2-95.1)	3.99	0.19
KLH IgM	0.655 (0.530- 0.765)	0.091	69.1 (55.2-80.8)	64.3 (35.2-87.1)	1.93	0.48

\* Foram apresentados apenas os testes que diferenciaram os dois grupos de pacientes.

AUC: área abaixo da curva ROC; IC: Intervalo de confiança; LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos; LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos; CO: valor acima dos quais são considerados positivos.

### 6.3 Discriminação dos grupos de pacientes com a fase crônica comparados com indivíduos sem esquistossomose e pacientes infectados com outras helmintoses

Nesta análise, o SWAP IgG (AAC = 0,905) e o SEA IgG (AAC = 0,720) apresentaram áreas significativamente diferentes de 0,5 ( $p = 0,0015$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) na curva ROC, indicando que os testes utilizados possuem capacidade de distinguir os grupos infectados com a forma crônica do grupo não infectado por *S. mansoni*, este último grupo inclui indivíduos saudáveis ou portadores de outras helmintoses (Tabela 3).

O SWAP IgG mostrou uma AAC significativamente mais alta quando comparada ao SEA IgG ( $P = 0,005$ ), o que indicou um alto poder discriminatório. Por outro lado, os pacientes crônicos não produziram anticorpos específicos suficientes em outros testes analisados (SEA IgM, SEA IgA, SWAP IgM, Sm14 IgA, Sm14 IgM, KLH IgM e KLH IgG), que apresentaram áreas sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na curva ROC. Mostrando que estes testes não possuem capacidade de discriminar a forma clínica crônica da esquistossomose de grupos saudáveis e portadores de outras helmintoses.

Tabela 3: Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação de pacientes com infecção crônica dos indivíduos sem esquistossomose, incluindo pacientes com outras helmintoses\*.

Testes	AAC (IC 95%)	CO	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-
SWAP IgG	0,905 (0,809- 0,962)	0,245	92,6 (82,1-97,9)	78,6 (49,2-95,1)	4,32	0,09
SEA IgG	0,720 (0,598- 0,822)	0,404	74,1 (60,3-85,0)	64,3 (35,2-87,1)	2,07	0,40

\*Foram apresentados apenas os testes que diferenciaram os dois grupos de pacientes.

AAC: área abaixo da curva ROC; IC: Intervalo de confiança; LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos; LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos, CO: valor acima dos quais são considerados positivos.

#### 6.4 DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS DE PACIENTES COM AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA ESQUISTOSSOMOSE COMPARADOS A INDIVÍDUOS SEM ESQUISTOSSOMOSE E PACIENTES INFECTADOS COM OUTRAS HELMINTOSES

Neste caso, os resultados mostraram que o SWAP IgG (AAC = 0,931) e o SEA IgG (AAC = 0,784) apresentaram áreas na curva ROC significativamente diferentes de 0,5 ( $p < 0,0001$ ), indicando que os testes utilizados possuem capacidade de distinção entre os grupos infectados com *S. mansoni* dos grupos sem esquistossomose, incluindo pacientes portadores de outras helmintoses (Tabela 4).

Para o SWAP IgG foi encontrada uma AAC significativamente mais alta quando comparada ao SEA IgG ( $p = 0,004$ ), indicando que o teste possui um alto poder discriminatório. Entretanto, pacientes esquistossomóticos (agudos e crônicos) não produziram anticorpos específicos em quantidade suficiente nos outros testes avaliados (SEA IgM, SEA IgA, SWAP IgM, Sm14 IgA, Sm14 IgM, KLH IgM e KLH IgG), os quais apresentaram áreas sem diferenças significativas de 0,5 ( $p > 0,05$ ), indicando que estes testes não possuem capacidade discriminatória (Tabela 4).

Tabela 4: Desempenho de vários testes sorológicos para discriminação de pacientes com infecção aguda e crônica da esquistossomose daqueles pacientes sem esquistossomose, incluindo pacientes com outras helmintoses\*.

Testes	AAC (IC 95%)	CO	Sensibilidade (IC 95% )	Especificidade (IC 95%)	LR+	LR-
SWAP IgG	0,931 (0,871- 0,969)	0,245	94,4 (88,3-97,9)	78,6 (49,2-95,1)	4,41	0,07
SEA IgG	0,784 (0,701- 0,853)	0,404	84,4 (76,2-90,6)	64,3 (35,2-87,1)	2,36	0,24

\*Foram apresentados apenas os testes onde houve diferenciação dos grupos.

AAC: área abaixo da curva ROC; IC: Intervalo de confiança; LR+: para resultados com probabilidade de serem positivos; LR-: para resultados com probabilidade de serem negativos; CO: valor acima dos quais são considerados positivo.

## 7. DISCUSSÃO

O diagnóstico correto de qualquer doença, seja a nível individual ou coletivo, é um instrumento importante que auxilia o estabelecimento de condutas adequadas para o tratamento dos portadores da infecção, permite aos serviços de saúde estimar as necessidades de intervenção em uma dada comunidade e selecionar quais as ações de controle são mais apropriadas a cada situação epidemiológica.

As formas clínicas e a sintomatologia da esquistossomose se assemelham às de muitas outras doenças, portanto essa inespecificidade e a variação nos sintomas dificultam o seu diagnóstico apenas pelo exame clínico do paciente. Por esse motivo, o diagnóstico definitivo é dado por exames laboratoriais, que podem ser feitos por métodos diretos, ou seja, que detectam a presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes ou tecidos, ou através de métodos indiretos, que se baseiam em técnicas imunológicas.

O diagnóstico da esquistossomose é baseado principalmente em métodos parasitológicos quantitativos e qualitativos, como o de Kato-Katz e Hoffman, Pons e Janner, respectivamente (TSANG *et al.*, 1983a). No entanto, os esquistossomos, são menos fecundos do que muitos helmintos e a maioria dos ovos ficam retidos nos tecidos (KLOETZEL, 1963), fazendo com que áreas onde a prevalência e a intensidade de infecção são consideradas baixas, os métodos parasitológicos tenham as suas sensibilidades diminuídas, subestimando o número de indivíduos positivos (NOYA *et al.*, 1997). Nesses casos, os métodos imunológicos são de fundamental importância sendo utilizados principalmente como métodos auxiliares em levantamentos epidemiológicos, para o controle de cura e para se tentar alcançar uma prevalência real (BERQUIST, 1992; NOYA *et al.*, 2006).

Outra aplicação importante do diagnóstico imunológico está na definição da fase aguda toxêmica da esquistossomose mansônica que, muitas vezes, constitui um desafio já que pacientes com infecção crônica provenientes de áreas endêmicas podem também apresentar um quadro clínico semelhante ao da esquistossomose aguda (LAMBERTUCCI *et al.*, 1994; RABELLO *et al.*, 1994). O diagnóstico das fases agudas, no período pré-postural de ovos, é importante para o tratamento precoce, pois pode evitar a evolução e o agravamento do quadro clínico para as formas

graves da doença. Além disso, a diferenciação das formas aguda e crônica é de extrema importância para a escolha do procedimento a ser adotado no tratamento da infecção.

Devido à importância de se estabelecer um diagnóstico precoce da esquistossomose e de se discriminar as fases aguda e crônica, o presente estudo utilizou os antígenos KLH, SEA, SWAP e o antígeno recombinante Sm14 com o objetivo de verificar a existência de novos padrões nos níveis de anticorpos entre essas fases da doença e a partir daí avaliar a capacidade de cada um em discriminá-las.

Nossos resultados mostram que o SEA IgA (AAC = 0,877) e o KLH IgM (AAC= 0,825) apresentaram um alto poder discriminatório da fase aguda da doença com relação a fase crônica, corroborando com os resultados obtidos por Rabello *et al.*, (1995), nos quais os títulos de IgA anti-SEA também se mostraram estatisticamente mais altos nos pacientes com a forma aguda e os níveis tanto de IgM quanto de IgG anti-KLH foram significativamente mais altos no grupo de pacientes com a forma aguda do que nos crônicos. Nasch *et al.*, (1981), Mansour *et al.*, (1989) e Beck *et al.*, (2004) também observaram níveis elevados de IgM e IgG em resposta ao antígeno KLH em pacientes com a forma aguda da doença. Porém, Xue *et al.*, (1991) não detectaram diferença significativa na especificidade e sensibilidade entre os antígenos IgG e IgM, entre os dois testes, em uma população de área endêmica *S. haematobium*.

Outros autores também encontraram os níveis de IgM e IgA anti-SEA e anti-SWAP significativamente mais altos no grupo de pacientes com a forma aguda do que no grupo de pacientes com a forma crônica da doença. (LIPING *et al.*, 1996; VALLI *et al.*, 1999; MAKAROVA *et al.*, 2005).

Os resultados acima referidos reforçam a utilização do KLH como um marcador diagnóstico devido a sua alta sensibilidade bem como a utilização do IgA anti-SEA como uma nova ferramenta para a diferenciação sorológica das formas aguda e crônica da esquistossomose humana. Assim, o KLH pode ser considerado uma alternativa viável para o diagnóstico a esquistossomose, corroborando com os dados de vários autores (RABELLO, 1997; RABELLO *et al.*, 1993, 1995; ALVES

BRITO *et al.*, 1992; YUESHENG *et al.*, 1994), que também sugerem a sua utilização no monitoramento da cura quimioterápica.

Por outro lado, os resultados aqui obtidos mostram que, dentre os testes utilizados principalmente, o SEA IgA, não foi capaz de distinguir pacientes esquistossomóticos (agudos e crônicos) dos indivíduos saudáveis ou infectados com outras helmintoses, contrastando com os dados existentes na literatura (VALLI *et al.*, 1997; THORS, LINDER, 1998; RABELLO *et al.*, 1995; VERWEIJ *et al.*, 1995; MARKL *et al.*, 1991; MANSOUR *et al.*, 1989; ZHENG *et al.*, 1992), mostrando que o IgA anti-SEA pode possibilitar reações cruzadas, não sendo recomendada para o diagnóstico diferencial em áreas endêmicas.

No presente estudo, o SWAP IgG e o SEA IgG foram capazes de distinguir pacientes esquistossomóticos (agudos e crônicos) de indivíduos sem esquistossomose, incluindo pacientes infectados com outras helmintoses (AAC = 0,931 e AAC = 0,784, respectivamente). No que se refere à discriminação entre indivíduos infectados por *A. lumbricoides* e *T. trichiura* e indivíduos saudáveis, nossos resultados não foram significativos estando de acordo com os obtidos por Valli *et al.*, (1997). Além disso, esses autores não obtiveram resultados satisfatórios quando compararam os níveis de IgG anti-SWAP e anti-SEA entre indivíduos portadores de outras parasitoses e os indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, sugerindo reação cruzada.

Oliveira *et al.*, (2005) utilizaram a dosagem de IgM através do ELISA como método para detecção de anticorpos IgM contra antígenos de verme adulto de *S. mansoni* e obtiveram 98% de sensibilidade quando comparado ao método Kato-Katz e 97% de especificidade quando comparado aos indivíduos saudáveis e portadores de outras helmintoses, demonstrando ainda uma eficácia de 97,8% em pacientes com carga parasitária baixa. Esses autores sugerem que este método pode ser utilizado em estudos de campo e em áreas de baixa endemicidade. Os resultados desses autores divergem dos obtidos no presente estudo já que o SWAP IgM apresentou área baixa sensibilidade e especificidade, não sendo capaz de discriminar nem os pacientes esquistossomóticos dos não esquistossomóticos e nem tampouco os pacientes com a fase crônica daqueles com a fase aguda da esquistossomose.



Muitos estudos têm sido feitos na tentativa de obter antígenos purificados e/ou marcadores de fases clínicas da doença, já que isso resultaria em diagnósticos com maior sensibilidade e especificidade. A fração Sm31/32 está entre as mais estudadas e com potencial para uso em imunodiagnóstico, tendo sido descrita primeiramente por Ruppel *et al.*, (1985a). A tecnologia do DNA recombinante tem viabilizado a produção purificada da fração Sm31/32 em grandes quantidades. Porém, ainda não se obteve uma padronização satisfatória destes testes utilizando-se esses antígenos (VALLI, 2001).

Makarova *et al.*, (2005) descreveram um novo imunodiagnóstico da forma aguda da esquistossomose, baseado na detecção da reatividade de IgG para o antígeno recombinante RP26 do *S. mansoni*, que foi capaz de detectar 83% do soro de pacientes com a forma aguda da doença, sugerindo que o RP26 pode ser utilizado como um teste imunodiagnóstico da esquistossomose mansônica.

No presente estudo o antígeno recombinante Sm14, extraído de vermes adultos de *S. mansoni* (TENDLER *et al.*, 1996), também foi testado para avaliar sua utilidade diagnóstica para discriminar as fases agudas e crônicas. Esse antígeno recombinante Sm14 é apontado como um candidato a uma promissora vacina para *S. mansoni*, pois possui epítomos que são reconhecidos preferencialmente por indivíduos naturalmente resistentes a esquistossomose (FONSECA *et al.*, 2004). Porém, em nenhum dos testes realizados nesse estudo o Sm14 se mostrou eficiente, seja para discriminar as fases aguda e crônica da esquistossomose mansônica, seja para discriminar indivíduos infectados daqueles sem esquistossomose.

Finalmente, os resultados encontrados sugerem que os testes mais apropriados para o uso ferramenta no diagnóstico da esquistossomose e na discriminação das fases clínicas aguda e crônica foram o SEA IgA e o SWAP IgG. Além disso, o SEA IgA e o KLH IgM também podem ser utilizados no diagnóstico da esquistossomose quando associadas aos dados de exames clínicos e epidemiológicos.

## 8. Conclusões

- Ao analisarmos os títulos de anticorpos IgA, IgG e IgM contra os antígenos testados (KLH, SEA, SWAP e Sm14) os resultados sugerem que os testes mais apropriados para a distinção das formas aguda e crônica da esquistossomose, sobretudo as imunoglobulinas IgA anti-SEA e IgM anti-KLH apresentaram um alto poder discriminatório entre esses pacientes.
- OS anticorpos IgG anti SEA e SWAP foram capazes de discriminar pacientes esquistossomóticos com a forma aguda dos pacientes portadores de outras helmintíases e dos indivíduos saudáveis.
- Os testes imunológicos utilizando os anticorpos IgA e IgG anti SEA e SWAP, respectivamente, possuem capacidade de discriminar os grupos de indivíduos infectados por *S. mansoni* dos indivíduos sem esquistossomose.
- Avaliando os níveis de anticorpos IgG anti SEA e SWAP podemos concluir que esses testes podem discriminar os paciente com a forma crônica da esquistossomose ao se comparar com os indivíduos sem a doença.
- Os testes aqui realizados com o antígeno recombinante Sm14 não foram capazes de discriminar as formas clínicas aguda e crônica, bem os esquistossomóticos dos não esquistossomóticos.
- Esses testes sorológicos descritos são úteis para a diferenciação das formas clínicas da esquistossomose de pacientes previamente diagnosticados, associados à dados clínicos e epidemiológicos, contribuindo para a confirmação e identificação de novos focos e no monitoramento de focos antigos com transmissão ativa.
- Podendo, também serem empregados em casuísticas com história epidemiológica e manifestações clínicas duvidosas, permitindo o tratamento precoce para a prevenção da forma crônica da doença.

## REFERÊNCIAS

- ALVES BRITO CF, et al. Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute *Schistosma mansoni*. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 86: 53-56. 1992.
- ANDRADE ZA, AZEVEDO TM. A contribution to the study of acute schistosomiasis (an experimental trial). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 82:311-317. 1987.
- ANDRADE ZA, AZEVEDO TM. Treatment of acute experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 84:447-484. 1989.
- BARBOSA CS. Epidemiology and anthropology: an integrated approach dealing with bio-socio-cultural aspects as strategy for the control of endemic diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 93 (Suppl. I): 59-62. 1998.
- BARBOSA CS et al. Spatial distribution of schistosomiasis foci on Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99 ( 5, Suppl. I): 55-62. 2004.
- BARBOSA C et al. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 17(3): 725-728. 2001a.
- BARBOSA CS et al. Assesment of schistosomiasis, through school surveys, in Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 101 (Suppl. I): 169-172. 2006.
- BARBOSA CS et al. Specific situations related to acute Schistosomiasis in Pernambuco, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 96 (Suppl. I): 169-172. 2001b.

- BARBOSA CS et al. Ecoepidemiology of urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 34(4): 337-341. 2000.
- BARRETO ML et al. Implications of faecal egg count variation when using Kato-Katz method to access *Schistosoma mansoni* infections. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 84: 554-555. 1990.
- BECK L et al. Replacing oxaminiquine by praziquantel against *Schistosoma mansoni* infection in a rural community from the sugar-cane zone of northeast Brazil: a epidemiological follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 96: 165-167. 2001.
- BECK L et al. Evaluation of tests base don the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99 (Suppl. I): 97-98. 2004.
- BERGQUIST NR. Present aspects of immunodiagnosis of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswado Cruz**, Rio de Janeiro, 87(Suppl.4): 29-38. 1992.
- BINA JC. Influência terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansoni. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, 10: 221-267. 1981.
- BINA JC. Specific therapy in the control of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 87 (Suppl. IV): 195-202. 1992.
- BOROS DL, WARREN KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, Chicago, 132: 488-507. 1970.
- BOCTOR FN, PETER JB. IgG sbclasses in human chronic schistosomiasis - over-production of schistosome-specific and non-specific IgG4. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, 82: 574-578. 1990.

- BRANDT JL, FINCH EP. A Simple flocculation slide test for diagnosis of schistosomiasis. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, 10: 141-152. 1946.
- CAMARGO-NEVES VLF et al. IgM antibodies to *Schistosoma mansoni* gut-associated antigens for the study of schistosomiasis in Ribeirão Pires, São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, 93(1): 273-278. 1998.
- COUDERT J et al. Diagnostic serologic par immunofluorescences sur coupes à la congélation d'infectious à *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*. **Acta Tropica**, Orlando, 25: 109-132. 1968.
- COURA JR, AMARAL RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic áreas. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, 99 (Suppl.I): 13-19. 2004.
- COUTINHO EM et al. Factors involved in *Schistosoma mansoni* onfection in rural areas of northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 92(5): 707-715. 1997.
- COUTINHO A, DOMINGUES ALC. **Esquistossomose mansônica**. In: DANI R, CASTRO LP eds. Gastroenterologia clínica. 3ª ed.. Rio de Janeiro: Guanabara, v.2, cap. 108, p.1697-1728. 1993.
- DEELDER AM et al. recognition of gut-associated antigens by immunoglobulin M in the direct florescent antibody test for schistosomiasis mansoni. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 83: 364-367. 1989.
- DE VLAS SJ et al. A model for variations in single and repeted egg counts in schistosomiasis mansoni. **Parasitology**, Cambridge, 104: 451-460. 1992.
- DE JONGE N et al. Detection of circulating anodic antigen by ELISA for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 82: 591-594. 1988.

- DOMINGUES ALC, DOMINGUES LAW. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA J. **Esquistossomose Mansônica**. Recife. Universitária (Ed.).1994. Cap. 5, p. 81-89.
- ENGELS D et al. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **America Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 54(4): 319-324. 1996.
- FARLEY NH. The discovery of a specific complement fixation test for bilharziasis and its practical application to clinical medicine. **J R Army Med Corps**, 32: 449-460. 1919.
- FARLEY NH, WILLIAMS FF. A preliminary report on an intradermal reaction in schistosomiasis. **Med J Austral**, 2: 811-818. 1927.
- FAVRE TC. **Impacto da quimioterapia com oxamniquine sobre a infecção por *Schistosoma mansoni* em duas localidades da área endêmica em Pernambuco**. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.
- FAVRE T et al. A longitudinal study on the natural infection of *Biomphalaria straminea* and *B. glabrata* by *Schistosoma mansoni* in an endemic área of schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 97: 465-475. 2002.
- FAVRE T et al. Evaluation of control measures implemented from 1977 to 1996 in the endemic área of schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, 34(6): 569-576. 2001.
- FAVRE T et al. Reability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 101 (Suppl. I): 73-78. 2006a.
- FAVRE T et al. Attaining the minimum target of resolution WHA 54.19 for schistosomiasis control in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99 (Suppl. I): 63-66. 2006b.

- FERREIRA AW, ÁVILASLM. **Diagnóstico Laboratorial** - Avaliação de Métodos de Diagnóstico das Principais Doenças Infecciosas e Parasitárias e Auto-imunes. Correlação Clínico Laboratorial. Guanabara-Koogan, 2a. ed. 2001.
- FLETCHER RH et al. **Clinical Epidemiology**. The Essentials. Baltimore: Willians & Wilkins. 1996.
- FONSECA CT et al. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 101 (Suppl. I): 73-78. 2004.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Controle da Esquistossomose**. Diretrizes Técnicas. 1ª ed. Brasília, 85pp, 1994.
- GARCIA SANTOS MMA et al. Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 94: 289. 2000.
- GRZYCH JM et al. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. **Journal of Experimental Medicine**, New York, 165: 865-878. 1987.
- HAMILTON JV et al. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. **Parasitology**, Cambridge, 117: 41-57. 1998.
- HILLYER GV et al. Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma masoni*: comparison of ELISA, radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigens from eggs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 28: 661-669. 1979.
- HLAING T. Ascariasis and childhood malnutrition. **Parasitology**, Cambridge, 107 (Suppl.): S125-136. 1993.
- HOFFMANN WA et al. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **The Journal of Public Health of Tropical Medicine**, Puerto Rico, 9: 283-298. 1934.

- HOSHINO S et al. A hemagglutination test for manson's schistosomiasis using chromium chloride, formalin treated human erythrocytes, sensitized with worm extracts. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 12: 192-194. 1970.
- HOSHINO S, KIMURA RT, CHIEFFI PP. Esquistossomose mansônica. In: Ferreira AW; Ávila SLM. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2001. Cap. 28, p. 290-298.
- HUGGINS DW, SANTOS AQ. Esquistossomose Mansônica – Fase Aguda. In: MALTA J. **Esquistossomose Mansônica**. Recife: Universitária (Ed.), cap. 5, p. 81-89. 1994.
- JESUS AMR et al. Clinical and Immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, 185: 98-105. 2002.
- KAGAN IG, OLIVER-GONZALEZ. Preliminary studies on hemagglutination in schistosomiasis. **Journal of Parasitology**, Lawrence, 41: 26. 1950.
- KANAMURA HY et al. class-specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 28: 242-248. 1979.
- KANAMURA HY et al. Anticorpos séricos IgA no diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansoni humana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 51(1/2): 101-104. 1991.
- KATZ N et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 14: 397-400. 1972.
- KATZ N, PEIXOTO SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, 33: 303-308. 2000.



- KLOETZEL K. Some quantitative aspects of diagnosis and epidemiology in schistosomiasis mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 12, 334. 1963.
- LAMBERTUCCI JR et al. The association of steroids and schistosomicides in the treatment of experimental schistosomiasis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 83: 354-357.1989.
- LAMBERTUCCI JR et al. Acute schistosomiasis mansoni: sonographic features. **Transactions of Royal Society of Medicine and Hygiene**, London, 88: 76-77. 1994.
- LIMA DMC et al. *Schistosoma mansoni* low infection. Evaluation of serologic assays. In:International Symposium of Schistosomiasis, Rio de Janeiro. **Anais**. 1993.
- LIMA DMC et al. Imunodiagnóstico da esquistossomose mansônica com baixa carga parasitária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, 29(2): 145-152. 1996.
- LIMA e COSTA MFF ROCHA et al. Avaliação da estabilidade na contagem de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método de Kato-Katz em uma zona endêmica da esquistossomíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, 17(1): 7-12. 1984.
- LIPPING C et al. The serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis japonica using IgA antibody to egg antigen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 91(6): 751-754. 1996.
- LONG EG et al. Comparison of ELISA, radioimmunoassay and stool examination for *Schistosoma mansoni* infection. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 75: 365-371. 1981.
- LOWRY OH et al. Protein the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, 193: 265-275. 1951.

- MAKAROVA E et al. Detection of IgG binding to *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26 is a sensitive and specific method for acute schistosomiasis diagnosis. **Parasitology International**, Kyoto, 54: 69-74. 2005.
- MANSOUR MM et al. Serological differentiation of acute and chronic Schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet haemocyanin. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 41(3): 338-344. 1989.
- MARKL J et al. Specific IgG activity of sera from Egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet haemocyanin (KLH). **Naturwissenschaften**, Frankfurt, 78: 30-31. 1991.
- MILLER P, WILSON RA. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, Cambridge, 77(3): 281-302. 1978.
- MILLER P, WILSON RA. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from lungs to the hepatic portal system. **Parasitology**, Cambridge, 80(2): 267-288. 1980.
- MONTENEGRO SML. Immunodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 87: 333-335. 1992.
- MOTT KE, DIXON H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. **Bull WHO**, Geneve, 60: 729-753. 1982.
- NASH TE. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 27: 938-943. 1978.
- NASH TE et al. Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, Bethesda, 126: 808-810. 1981.
- NEVES J. **Esquistossomose mansoni: Clínica da Forma Aguda ou Toxêmica**. Ed. Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, RJ. 1986.

- NOYA BA et al. Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. **Acta Tropica**, Orlando, 66: 69-78. 1997.
- NOYA O, NOYA BA. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. **Immunology Letters**, Videnska, 63: 53-56. 1998.
- NOYA O et al. Immunogenicity of synthetic proteins from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasite Immunology**, Canadá, 23(11): 567-573. 2001.
- NOYA BA et al. Low transmission areas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 101(Suppl. I): 29-35. 2006.
- OLIVEIRA EJ et al. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 100(4): 421-425. 2005.
- OLIVIER-GONZALEZ J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, 95: 86-91. 1954.
- OMER ALI P et al. Antibody to carbohydrate and polypeptide epitopes on the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in Egyptian patients with acute and chronic schistosomiasis. **Parasitology**, Cambridge, 98: 417-424. 1989.
- PELLEY RP et al. Purified antigen radioimmunoassay in serological diagnosis of schistosomiasis mansoni. **The Lancet**, Reino Unido, 2: 781-786. 1977.
- PESSÔA SB, MARTINS AV. **Parasitologia Médica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. Cap.35, p. 361-381. 1982.
- PIERCE EJ et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, 173: 159. 1991.

- PRATA A. Experience in Brazil with the use of available schistosomicides in mass treatment campaigns. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, 10: 355-360. 1976.
- PRATA A. The role of scientific research in control of schistosomiasis in endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99 (Suppl. I): 5-11. 2004.
- RABELLO ALT et al. Dot-dye-immunoassay and dot-ELISA for the serological differentiation of acute and chronic *Schistosma mansoni* using keyhole limpet haemocyanin as antigen. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 87: 279-281. 1993.
- RABELLO A. Diagnosing Schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 92(5): 669-676. 1997.
- RABELLO A, ENK M. 2007. Progress towards the detection of schistosomiasis. **Report of Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis**, Geneva, **TDR/SWG/07**: 67-71.
- RABELLO ALT et al. Humoral responses in patients with acute *Schistosomiasis mansoni* infection who were followed up two years after treatment. **Clinical of Infectious Disease**, Chicago, 24: 304-308. 1997.
- RABELLO ALT et al. Humoral immune responses in acute *Schistosomiasis mansoni*: relation to morbidity. **Clinical of Infectious Disease**, Chicago, 21: 608-615. 1995.
- RABELLO ALT et al. Stool examination and rectal biopsy in the diagnosis and therapeutical evaluation of *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 34: 601. 1992.
- RABELLO ALT et al. Abdominal ultrasonography in acute clinical schistosomiasis mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 50: 748-752. 1994.
- REY L. **Parasitologia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001.

- ROSS AG et al. Schistosomiasis. Review. **New England Journal of Medicine**, Boston, 346 (16): 1212-1220. 2002.
- RUPPEL A et al. Western blot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, 62: 499-506. 1985a.
- RUPPEL A et al. *Schistosoma mansoni*: Western blot analysis of adult worm proteins. **Experimental Parasitology**, London, 60: 195-206. 1985b.
- RUPPEL A et al. Sera of *Schistosoma japonicum* infected patients cross-react with diagnostic 31/32kD proteins of *S. mansoni*. **Clinical Experimental Immunology**, London, 69: 291-298. 1987.
- SABROZA PC, LEAL MC. Saúde, ambiente e desenvolvimento. Alguns conceitos fundamentais. In: LEAL MC; SABROZA PC; RODRIGUEZ RH; BUSS PM. **Saúde, Ambiente e Desenvolvimento. Volume I. Uma Análise Interdisciplinar**. Editora HUCITEC-ABRASCO, São Paulo - Rio de Janeiro. p.45-93. 1992.
- SACKETT DL et al. **Clinical Epidemiology**. A basic science for clinical medicine. Boston, Little Brown and company, p. 1-185. 1991.
- SADUN EH et al. Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of schistosomiasis in humans. **Proceedings of the Society Experimental Biology of Medicine**, California, 105: 289-291. 1960.
- SANDOVAL N et al. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. **Parasitology**, Cambridge, 133(Pt5): 581-587. 2006.
- SILVA MR et al. Pesquisa de anticorpos IgM contra tubo digestivo do verme para diagnóstico da esquistossomose mansônica. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Brasília, 28(2): 39-42. 1992.
- SLEIGH A et al. Comparison of filtration staining (Bell) and thick smear (Kato) for the detection and quantitation of *Schistosoma mansoni* eggs in faeces. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 79: 369-373. 1982.

- SMITHERS SR, DOENHOFF MJ. Schistosomiasis. In: COHEN S & WARREN KS. **Immunology of Parasitic Infections**. London, p. 597-607. 1982.
- SULAHIAN A et al. Development and evaluation of a Western Blot Kit for diagnosis of schistosomiasis. **Clinical and Diagnostic Laboratorial Immunology**, Washington, 12(4): 548-551. 2005.
- SUZUKI T et al. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. **Parasitology International**, Kyoto, 55(3): 213-218. 2006.
- TEESDALE CH et al. Egg count variability and sensitivity of a thin smear technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 79: 369-373. 1985.
- TENDLER M et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proceedings of National Academy of Science USA**, Stanford, 93: 269-273. 1996.
- THORS C, LINDER E. Cross reacting antibodies against keyhole limpet haemocyanin may interfere with the diagnostics of acute schistosomiasis. **Parasite Immunology**, Danver, 20: 489. 1998.
- TSANG VCW et al. The enzyme-linked immuno-electrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. **Methods Enzymology**, California, 92: 377-391, 1983a.
- TSANG VCW et al. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serological reagent. I- Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. **Journal of Immunology**, Bethesda, 130: 1359-1365. 1983b.
- TSANG VCW, WILKINS PP. Immunodiagnosis of schistosomiasis. **Clinics Lab Med** 11(4): 1029-1039. 1991.
- TSANG VCW, WILKINS PP. Immunodiagnosis of schistosomiasis. **Immunological Investigations**, California, 26(1,2): 17188. 1997.

- VALLI LCP. **Imunoseleção e clones de genoteca de cDNA de *Schistosoma mansoni* através de anticorpos dissociados de imunocomplexos.** Tese (Doutorado) 106p, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2001.
- VALLI LCP et al. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of an serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 57(3): 358-362. 1997.
- VALLI LCP et al. Schistosomiasis mansoni: Western blot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, 61(2): 302-307. 1999.
- VAN LIESHOUT L et al. Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni a low endemic area in Surinam by determination of the circulation antigens CAA and CCA. **Acta Tropica**, Orlando, 59: 19-29. 1995.
- VERWEIJ JJ 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 98: 48-50. 1995.
- VOGEL H, MINNING W. Hüllenbildung bei bilharzias-cercarien im serum bilharzias-infizierter tiere und menschen. **Zentbl Bakt Parasitk** 153:91-105. 1949.
- WHO. The Control of Schistosomiasis. **World Health Organization, Technical Report Series**, 830, 86pp. Geneva, 1993.
- XUE CG et al. Diagnosis of *Schistosoma haematobium* infection: evaluation of ELISA using keyhole limpet haemocyanin or soluble egg antigen in comparison with detection of eggs or haematuria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 87(6): 654-658. 1993.
- YUESHENG L et al. The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as

antigen. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, 88: 249-251. 1994.

ZHENG XF et al. Studies on the KLH-ELISA and KLH-IHA for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control** 4: 57-58. In: HAMILTON JV; KLINKERT M; DOENHOFF MJ. 1998. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. **Parasitology**, Cambridge, 117 suppl.: S41-57. 1992.



## **ANEXOS**

## **APÊNDICES**



## COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

### Projeto

“Avaliação de abordagens sorológicas para discriminação das formas agudas e crônicas da esquistossomose mansônica humana”

**Coordenador:** Sílvia Maria Lucena Montenegro

Departamento de Imunologia/CPqAM

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 02/2003

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

Recife, 12 de março de 2003



Dra. Nilma Cintra Leal  
Pesquisador Titular  
Coordenação  
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

## SHORT COMMUNICATION

## Evaluation of Tests Based on the Antibody Response to Keyhole Limpet Haemocyanin and Soluble Egg Antigen to Differentiate Acute and Chronic Human Schistosomiasis Mansoni

Lílian Beck\*, Daniele SM Van-Lüme/<sup>++</sup>, Joelma R de Souza, Clarice N Lins de Moraes, Wladimir G Melo, Edeneide Xavier, Constança S Barbosa, Marcílio L Aroucha\*\*, Ana Lúcia C Domingues\*\*, Tereza Favre\*, Otávio Pieri\*, Frederico GC Abath, Sílvia ML Montenegro/<sup>+</sup>

Departamento de Imunologia, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n°, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil \*Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ Brasil \*\*Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

*Specific IgG and IgM responses to soluble egg antigen (SEA) and keyhole limpet haemocyanin (KLH) were measured by ELISA in patients with acute and chronic schistosomiasis. The tests based upon IgM and IgG antibodies responses to KLH presented the best diagnostic discrimination, and can be used in conjunction with clinical and epidemiological data to the differential diagnosis of acute schistosomiasis.*

Key words: keyhole limpet haemocyanin - soluble egg antigens - enzyme-linked immunosorbent assay

The diagnosis of schistosomiasis mansoni is classically made by stool parasitological techniques. In high and moderate prevalence areas, the detection of parasite eggs is simple and accurate (Tsang et al. 1983). However, the sensitivity of parasitological methods decreases in areas where the prevalence and intensity of transmission of schistosomiasis are low (Noya et al. 1997), and there are suggestions that, in this situation, serologic tests would be useful.

The discrimination of acute and chronic stages of the disease allows for early treatment and prevention of the severe forms of the disease. In addition, the possibility of diagnosing acute schistosomiasis contributes to defining geographic regions with active transmission (Valli et al. 1999). Although there are several serological approaches proposed to differentiate acute and chronic schistosomiasis, we have noticed some conflicting results (Verweij et al. 1995), justifying a re-evaluation of some of the proposed tests.

In this preliminary work we investigated the antibody responses to keyhole limpet haemocyanin (KLH) and soluble egg antigens (SEA) antigens, as markers of acute and chronic clinical forms of schistosomiasis.

We studied 54 patients with acute schistosomiasis from an unusual outbreak, caused by environmental imbalances

at Porto de Galinhas beach in 2000 (Barbosa et al. 2001) and 54 chronic patients including intestinal, hepatointestinal and hepatosplenic forms of schistosomiasis, from São Lourenço da Mata, an endemic area in the state of Pernambuco (Beck et al. 2001). The protocol study was approved by the Ethical Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz.

Blood samples (5 ml) were taken with heparin (10 U/ml) and after centrifugation, the plasma was kept frozen at -20°C until testing. Specific IgG and IgM antibodies to SEA and KLH were measured by ELISA. For simplicity, we will denominate these tests KLH IgM, KLH IgG, SEA IgM, and SEA IgG. The general ELISA procedures were performed according to Yuesereng et al. (1994) for KLH antigen and Valli et al. (1997) for SEA antigen. We used KLH and SEA at concentrations of 2 ng/μl and 10 μg/ml, respectively, for the detection of IgM and IgG antibodies. The dilutions of plasma were 1:2000 for the KLH IgM and KLH IgG, and 1:400 and 1:200 for the SEA IgM and SEA IgG, respectively. The horseradish peroxidase goat anti-human Ig was 1000 fold diluted for the KLH tests, and 2500 and 3000 diluted, for the SEA IgM and SEA IgG, respectively. The SEA antigen was obtained according to Pearce et al. (1991); the protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951), and aliquots were lyophilized in small aliquots before storing at -70°C.

The optical densities (OD) were transformed to AUE (arbitrary units of ELISA), that were defined as the ratio between the OD of the sample and the OD of a reference plasma. The cut-off was defined as the mean plus 1 standard error of plasma samples of chronic patients.

The groups with acute and chronic infection differed significantly respecting the levels of IgM and IgG antibodies to KLH ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and SEA ( $p = 0.0002$  and  $p < 0.0001$ , respectively) (Figure).

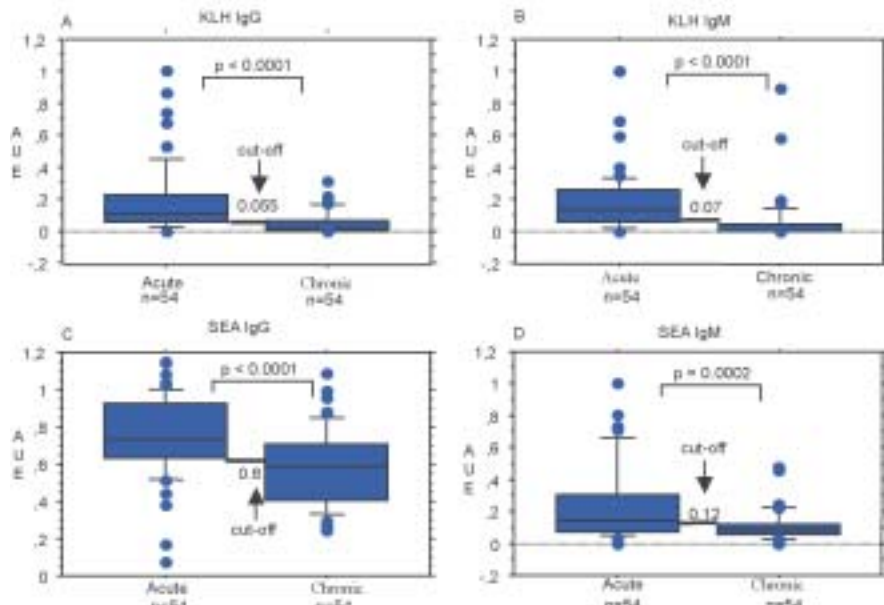
Financial support: CNPq, Fiocruz

<sup>+</sup>Corresponding author. Fax: + 55-81-3453.1911. E-mail: silvia@cpqam.fiocruz.br.

<sup>++</sup>Fellow CNPq, Pibic-Fiocruz

Received 28 May 2004

Accepted 26 July 2004



Box plot percentiles of the levels of IgG and IgM antibodies to keyhole limpet haemocyanin (A and B), and soluble egg antigens (C and D), measured by ELISA in plasma of acute and chronic schistosomiasis patients, were expressed as AUE (arbitrary unit of ELISA). The cut-off is indicated by arrow.

Finally, we calculated the sensitivity to detect acute cases and the specificity to detect chronic cases for each assay. The sensitivities of KLH IgG, KLH IgM, SEA IgG and SEA IgM were 74.5, 70.9, 80 and 56.4%, respectively. The specificities of KLH IgG, KLH IgM, SEA IgG and SEA IgM were 72.2, 79.6, 51.9 and 75.9%, respectively. Thus, KLH IgM, and KLH IgG were the tests that displayed the best diagnostic discrimination, providing the best trade off between sensitivity and specificity were taken into account.

The results show that the evaluated assays can be used in conjunction with clinical and epidemiological data in attempts to discriminate acute and chronic schistosomiasis. Although we have focused in the discrimination of acute and chronic schistosomiasis in patients previously diagnosed with schistosomiasis, we are currently evaluating the possibility to use combinations of serological tests to simultaneously establish the diagnosis of schistosomiasis, and discriminate different clinical forms of the disease. In addition, we are analyzing more deeply the results using additional statistical tools, including receiver-operating characteristics analysis.

#### REFERENCES

- Barbosa CS, Domingues ALC, Abath FGC, Montenegro SML, Guida U, Carneiro J, Tabosa B, Moraes CNL, Spinelli V 2001. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cad Saúde Públ* 17: 725-728.
- Beck L, Favre TC, Pieri OS, Zani LC, Domás GG, Barbosa CS 2001. Replacing oxamniquine by praziquantel against *Schistosoma mansoni* infection in a rural community from sugarcane zone of Northeast Brazil: an epidemiological follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 (Suppl. 1): 165-167.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193: 265-275.
- Noya BA, Cesari IM, Losada S, Colmenares C, Balzan C, Hoebeke J, Noya O 1997. Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop* 66: 69-78.
- Pearce EJ, Caspar P, Gryzch JM, Lewis FA, Sher A 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exper Med* 173: 159-164.
- Tsang VCW, Tsang KR, Hancock K, Kelley MA, Wilson BC, Maddison SE 1983. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serological reagent. I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. *J Immunology* 130: 1359-1365.
- Valli LC, Kanamura HY, da Silva RM, Silva MIPG, Velloso SAG, Garcia ET 1997. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and serological distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 57: 358-362.
- Valli LC, Kanamura HY, da Silva RM, Ribeiro-Rodrigues R, Dietze R 1999. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* 61: 302-307.
- Verweij JJ, Polderman AM, Visser LG, Deelder AM 1995. 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* 89: 48-50.
- Yuesheng L, Rabello ALT, Simpson AJG, Katz N 1994. The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 249-251.

Discrimination acute from chronic human schistosomiasis mansoni: a ROC curve analysis of nine ELISA based tests.

Lílian Beck \*, Daniele S. M. Van-Lüme, Joelma R. Souza, Tereza Favre \*, Frederico G.C. Abath †, Silvia M.L. Montenegro/<sup>†</sup>.

Departamento de Imunologia, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil. \*Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz, Av. Brasil 4365-900 Rio de Janeiro, RJ Brasil.\*\*Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

ABSTRACT

Specific IgA, IgG and IgM responses to different antigen targets (SEA, SWAP, KLH, Sm14) were measured by ELISA in patients with acute and chronic schistosomiasis, as well as patients without schistosomiasis. SEA IgA and KLH IgM presented high discriminatory powers to distinguish acute from chronic schistosomiasis, with calculated AUCs (areas under the ROC curve) of 0.877 and 0.825, respectively. On the other hand, these tests, particularly SEA IgA were not useful to distinguish schistosomiasis (including the acute form) from patients without this disease (including other parasite infections). By contrast, SWAP IgG and SEA IgG were able to discriminate schistosomiasis patients from healthy individuals and patients infected with other parasites (AUCs of 0.931 and 0.784, respectively). Thus, it is possible to use a combination of serological tests, such as SEA IgA and SWAP IgG, to simultaneously establish the diagnosis of schistosomiasis and discriminate the acute from the chronic forms of the disease.

Key words: KLH – SEA – SWAP – ELISA – differential diagnosis – *Schistosoma mansoni* – ROC curve analysis.

Financial support: CNPq, Fiocruz (internal funds).

<sup>†</sup> Corresponding author. Fax: + 55-81-3453.1911. E-mail: [silvia@cpqam.fiocruz.br](mailto:silvia@cpqam.fiocruz.br)

<sup>†</sup> *In memoriam*



## INTRODUCTION

Despite a low and variable morbidity, schistosomiasis remains one of the most prevalent parasite infection and has substantial public health importance (Gryseels et al., 2006).

Acute schistosomiasis occurs as an early manifestation of infection with *Schistosoma* species, in non-immune individuals exposed to cercariae-infested water in endemic regions. This syndrome is characterized by an acute febrile stage, often associated with pulmonary and/or abdominal symptoms and may develop 2-10 weeks after the initial infection (Bottieau et al., 2006). Clinical manifestations of acute schistosomiasis are usually mild, transient, non-specific, and diagnosis is easily overlooked when exposure is not properly considered (Bottieau et al., 2006). Many cases of acute schistosomiasis have been reported among tourists either visiting endemic areas or sites of seasonal transmission in coastal areas (Barbosa et al., 2001a; Barbosa et al., 2001b; Bottieau et al., 2006; Verweij et al., 1995). The diagnosis of schistosomiasis mansoni is classically made by stool parasitological techniques. However, in situations in which there is a low parasite burden or at the early stage of infection serologic tests would be more useful (Oliveira et al., 2003; Thors & Linder, 1998).

The discrimination of acute from chronic stages of the disease, allows for early treatment and prevention of ectopic or severe forms of the disease. In addition, precise identification of acute schistosomiasis is important for evaluating of *Schistosoma* transmission rate and definition of geographic regions with active transmission (Valli et al., 1999). Thus, the possibility of diagnosing acute schistosomiasis is relevant for the control of schistosomiasis. Although there are some serological approaches proposed to differentiate between acute and chronic schistosomiasis (Alves-Brito et al., 1992; Beck et al., 2004; Makarova et al., 2005; Valli et al., 1999), there is no general agreement about their usefulness as a tool for serological diagnosis of acute schistosomiasis (Thors & Linder, 1998; Verweij et al., 1995). Thus, herein 9 different ELISA based tests were investigated by using ROC curve analysis, aiming at assessing the ability to discriminate 54 patients acutely infected from 54 patients chronically infected with schistosomiasis.

## MATERIALS AND METHODS.

**Population studied.** We studied 108 schistosomiasis patients, 54 patients were acutely infected as a result of an unusual outbreak at Porto de Galinhas beach in 2000 (Barbosa et al., 2001a). Fifty four patients were chronically infected (including intestinal (n = 53)

and hepatointestinal (n = 1) forms of schistosomiasis), and lived in São Lourenço da Mata, an endemic area in the state of Pernambuco (Beck et al., 2001). The control group (n = 15) was formed by healthy individuals without epidemiological history compatible with schistosomiasis, and also included patients infected with other parasites.

**Collection of samples.** Blood samples (5 ml) were taken by venepuncture with heparin (10U/ml). After centrifugation, the plasma was kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing.

**Imunoassays.** Specific IgG, IgM and IgA responses to soluble egg antigen (SEA), soluble adult worm preparations (SWAP), recombinant antigen Sm14, and keyhole limpet haemocyanin (KLH) were measured by ELISA. For simplicity, we will denominate these tests SEA IgM, SEA IgG, SEA IgA, SWAP IgM, SWAP IgG, Sm14 IgA, Sm14 IgM, KLH IgM, and KLH IgG. We used KLH and SEA at concentrations of 2 ng/ $\mu\text{l}$  and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively for the detection of IgM and IgG antibodies. Sm14 was used at concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  respectively for the detections of IgG and IgA. The dilutions of plasma were 1:2,000 for the KLH IgM and KLH IgG, and 1:400 and 1:200 for the SEA IgM and SEA IgG, respectively. The dilution of plasma were 1:100 for the SWAP IgG and IgM, and 1:100 and 1:50 for the Sm14 IgG and IgA, respectively. The horseradish peroxidase goat anti-human Ig was 1,000 fold diluted for the KLH tests, and 2,500 and 3,000 diluted, for the SEA IgM and SEA IgG, respectively. The dilutions were 1:750 to IgM and 1:1500 to IgG for SWAP tests, and 1:3,000 and 1:750 for the Sm14 IgG and IgA, respectively. The SEA antigen was obtained according to Pearce et al., 1991, the protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951), and aliquots were lyophilized in small aliquots before storing at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The SWAP antigen was obtained according to Boros and Warren (1970).

**Statistical analysis.** Medcalc V8.1 was used for receiver operating characteristics (ROC) analysis, plotting and determination of the cut-off. ROC plot displayed sensitivity versus 1-specificity, such that the areas under the curve (AUCs) generated varied from 0.5 to 1.0, with higher values indicating increased discriminatory ability. When the variable under study cannot distinguish between two groups, the area will be equal to 0.5 (the ROC curve will coincide with the diagonal). The cut-off was selected to yield the highest accuracy (minimal false negative and false positive results). Comparisons of AUCs were performed using non parametric assumptions. Sensitivity, specificity, and the likelihood ratio for a given result were calculated as described (Sackett et al., 1991). A likelihood ratio expresses the odds that a given diagnostic test



result would be expected in a patient with (as opposed to one without) the target disorder. The optical densities (OD) were transformed to AUE (arbitrary units of ELISA), that were defined as the ratio between the OD of the sample and the OD of a reference serum. The differences were considered significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **Discrimination of acute from chronic schistosomiasis.**

The hypothesis that the area under the ROC curve is 0.5 (null hypothesis: AUC = 0.5) was tested for all immunossays studied. SEA IgA, SEA IgG, SEA IgM, SWAP IgG, KLH IgM, and KLH IgG presented areas under the ROC curve significantly different from 0.5 ( $P < 0.05$ ), indicating that these laboratory tests have an ability to distinguish between the groups acutely infected from the group chronically infected. By contrast, Sm14 IgA, Sm14 IgG, and SWAP IgM presented areas under the ROC curve not significantly different from 0.5 ( $P > 0.05$ ), indicating that these laboratory tests do not have discriminatory capability. Thus, the latter tests were not considered herein for further analysis.

SEA IgA displayed the highest AUC (AUC = 0.877, Table 1 and Figure), a parameter reflecting discriminatory ability. Indeed, a significantly higher AUC was found for SEA IgA compared with SEA IgG ( $P = 0.012$ ), SEA IgM ( $P < 0.001$ ), and SWAP IgG ( $P = 0.005$ ). However the differences in AUCs were not statistically significant in comparison to either KLH IgM or KLH IgG (AUCs of 0.825 and 0.793, respectively), which also presented high AUCs (Table 1).

Similarly to SEA IgA, KLH IgM also presented a relatively high AUC. Nonetheless, this area was not significantly different ( $P > 0.05$ ) in comparison to SEA IgG, SEA IgM, SWAP IgG, KLH IgM, and KLH IgG. Differences between the AUCs displayed by SEA IgG, KLH IgG, SWAP IgG, and SEA IgM were not significantly different (Table 1, Figure) indicating a similar discriminatory ability.

The cut off was calculated to provide the best trade off between sensitivity and specificity. The resulting sensitivity, specificity and likelihood ratio for the several discriminative immunossays studied are shown in Table 1.

### **Discrimination of acutely infected patients from patients without schistosomiasis.**

SWAP IgG (AUC = 0.958), SEA IgG (AUC = 0.847), and KLH IgM (AUC = 0.655) presented areas under the ROC curve significantly different from 0.5 ( $P < 0.0001$ ,  $P <$

0.0001, and  $P = 0.0438$ , respectively), indicating that these laboratory tests have an ability to distinguish between the groups acutely infected from the group without schistosomiasis, including patients harboring other parasites (Table 2). SWAP IgG displayed the highest AUC (Table 2), a parameter reflecting discriminatory ability. Indeed, a significantly higher AUC was found for SWAP IgG compared with either SEA IgG ( $P = 0.026$ ) or KLH IgM ( $P < 0.001$ ). In addition, the AUC displayed by SEA IgG was significantly higher than the one presented by KLH IgM ( $P = 0.018$ ) indicating a higher discriminatory power (Table 2). On the other hand, acutely infected patients did not produce significant amounts of specific antibodies in the other assays studied (SEA IgM, SEA IgA, SWAP IgM, Sm14 IgA, Sm14 IgM, and KLH IgG), presenting areas under the ROC curve not significantly different from 0.5 ( $P > 0.05$ ), indicating that these laboratory tests do not have discriminatory capability. Thus, the latter were not considered herein for further analysis.

The cut off was calculated to provide the best trade off between sensitivity and specificity. The resulting sensitivity, specificity and likelihood ratio for the discriminative immunosassays studied are shown in Table 2.

### **Discrimination of chronically infected patients from patients without schistosomiasis.**

SWAP IgG (AUC = 0.905) and SEA IgG (AUC = 0.720) presented areas under the ROC curve significantly different from 0.5 ( $P = 0.0015$  and  $P < 0.0001$ , respectively), indicating that these laboratory tests have an ability to distinguish between the groups acutely infected from the group without schistosomiasis, including patients harboring other parasites (Table 3). A significantly higher AUC was found for SWAP IgG compared with either SEA IgG ( $P = 0.005$ ), indicating a higher discriminatory power (Table 3). On the other hand, chronically infected patients did not produce significant amounts of specific antibodies in the other assays studied (SEA IgM, SEA IgA, SWAP IgM, Sm14 IgA, Sm14 IgM, KLH IgM, and KLH IgG), presenting areas under the ROC curve not significantly different from 0.5 ( $P > 0.05$ ), indicating that these laboratory tests do not have discriminatory capability. Thus, the latter were not considered herein for further analysis.

The cut off was calculated to provide the best trade off between sensitivity and specificity. The resulting sensitivity, specificity and likelihood ratio for the discriminative immunosassays studied are shown in Table 3.

**Discrimination of schistosomiasis patients (both acutely and chronically infected) from patients without schistosomiasis.**

SWAP IgG (AUC = 0.931) and SEA IgG (AUC = 0.784) presented areas under the ROC curve significantly different from 0.5 ( $P < 0.0001$ ), indicating that these laboratory tests have an ability to distinguish between the groups infected with *Schistosoma mansoni* from the group without schistosomiasis, including patients harboring other parasites (Table 4). A significantly higher AUC was found for SWAP IgG in comparison with SEA IgG ( $P = 0.004$ ), indicating a higher discriminatory power (Table 4). On the other hand, schistosomiasis patients did not produce significant amounts of specific antibodies in the other assays studied (SEA IgM, SEA IgA, SWAP IgM, Sm14 IgA, Sm14 IgM, KLH IgM, and KLH IgG), which presented areas under the ROC curve not significantly different from 0.5 ( $P > 0.05$ ), indicating that these laboratory tests do not have discriminatory capability. Thus, the latter were not considered herein for further analysis.

The cut off was calculated to provide the best trade off between sensitivity and specificity. The resulting sensitivity, specificity and likelihood ratio for the discriminative immunosassays studied are shown in Table 4.

**DISCUSSION.**

Detection of excreted eggs is an insensitive method for detection of acute schistosomiasis, which is more commonly seen in travelers and visitors to endemic areas following their exposure to cercariae in infested water.

A few immunodiagnostic methods based on the detection of specific antibody isotypes (IgA and IgM) against parasite derived antigens (SWAP and SEA) were proposed to differentiate acute from chronic schistosomiasis, because they were more abundant in the acute stage of schistosomiasis (Valli et al., 1999; Valli et al., 1997). Recently, a method for acute schistosomiasis diagnosis was described, based upon detection of IgG reactivity to the *S. mansoni* recombinant antigen RP26 (Makarova et al., 2005). This assay was capable of detecting 83% (15/18) of sera from acute schistosomiasis patients. On the other hand, only 68 % (17/25) of sera from chronic schistosomiasis were negative, indicating that 32 % of chronically infected patients would be misdiagnosed as acute schistosomiasis (Makarova et al., 2005). In addition, several studies have supported the use of IgG and IgM responses to KLH to detect schistosomiasis patients during the acute phase of the disease and to distinguish them

from patients with chronic infection, as well as individuals with other parasitic diseases (Alves-Brito et al., 1992; Mansour et al., 1989). KLH extracted from the marine mollusk *Megathura crenulata*, shares a carbohydrate epitope with an antigen that is also present on the schistosomal surface (Mansour et al., 1989; Verweij et al., 1995). By contrast, Verweij et al. (1995) found that antibody responses to KLH could not discriminate acute schistosomiasis in visitors to an endemic area from infections contracted 15 months ago. Moreover, another study has shown that cross reacting antibodies against KLH may interfere with the diagnostics of acute schistosomiasis (Thors & Linder, 1998).

In the present paper, SEA IgA and KLH IgM presented high discriminatory powers to distinguish acute from chronic schistosomiasis (Table 1, Figure) with calculated AUCs of 0.877 and 0.825, respectively. On the other hand, these tests, particularly SEA IgA were not useful to distinguish schistosomiasis (including the acute form) from patients without this disease (including those infected with other parasites), as noticed before (Thors & Linder, 1998; Valli et al., 1997). By contrast, SWAP IgG and SEA IgG were able to discriminate schistosomiasis patients from healthy individuals and patients infected with other parasites (AUCs of 0.931 and 0.784, respectively), in agreement with other studies (Valli et al., 1997). Thus, although we have focused in the discriminations of acute and chronic schistosomiasis in patients previously diagnosed as schistosomiasis, it is possible to use a combination of serological tests, such as SEA IgA and SWAP IgG, to simultaneously establish the diagnosis of schistosomiasis and discriminate the acute from the chronic forms of the disease.

In conclusion, the results show that SEA IgA and KLH IgM can be used in conjunction with clinical and epidemiological data to discriminate acute and chronic schistosomiasis. Furthermore, if used in combination, SEA IgA and SWAP IgG can be helpful in diagnosing schistosomiasis as well as discriminating their acute and chronic clinical forms.

#### **Acknowledgements.**

We are thankful to Otavio Pieri and Constança Barbosa for providing us with sera from schistosomiasis patients. Financial support for this work was provided by Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and CNPq (Brazilian Research Council). FGC Abath and SML Montenegro are recipients of CNPq fellowships.

Figure. A receiver operating characteristic plot is shown, illustrating the ability of some of the tests studied to discriminate acute from chronic schistosomiasis. Areas under the curve, and their 95% confidence intervals are shown in Table for each assay. Higher areas under the curve indicate better overall discrimination (global performance) of the test.

Table 1. Performance of several serological assays to discriminate acute from chronic schistosomiasis. Only the discriminative tests are presented.

Assay	AUC (95% CI)	Cut-off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	LR+	LR-
SEA IgA	0.877 (0.800-0.932)	0.054	80.0 (67.0-89.6)	87.0 (75.1-94.6)	6.17	0.23
KLH IgM	0.825 (0.741-0.891)	0.041	80.0 (67.0-89.6)	75.9 (62.4-86.5)	3.32	0.26
KLH IgG	0.793 (0.645-0.818)	0.059	74.5 (61.0-85.3)	75.9 (62.4-86.5)	3.10	0.34
SEA IgG	0.738 (0.704-0.864)	0.641	70.9 (57.1-82.4)	68.5 (54.4-80.5)	2.25	0.42
SWAP IgG	0.712 (0.617-0.795)	0.962	63.0 (48.7-75.7)	70.4 (56.4-82.0)	2.12	0.53
SEA IgM	0.669 (0.572-0.756)	0.098	61.8 (47.7-74.6)	64.8 (50.6-77.3)	1.76	0.59

AUC, area under the ROC curve; 95% CI, 95% confidence interval; LR+, likelihood ratio for a positive result; LR-, likelihood ratio for a negative result.

Table 2. Performance of several serological assays to discriminate acutely infected patients from patients without schistosomiasis. Only the discriminative tests are displayed.

Assay	AUC (95% CI)	Cut-off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	LR+	LR-
SWAP	0.958 (0.879-0.991)	0.427	87.0 (75.1-94.6)	85.7 (57.2-97.8)	6.09	0.15
IgG						
SEA IgG	0.847 (0.740-0.922)	0.55	85.5 (73.3-93.5)	78.6(49.2- 95.1)	3.99	0.19
KLH IgM	0.655 (0.530-0.765)	0.091	69.1 (55.2-80.8)	64.3 (35.2-87.1)	1.93	0.48

AUC, area under the ROC curve; 95% CI, 95% confidence interval; LR+, likelihood ratio for a positive result; LR-, likelihood ratio for a negative result.

Table 3. Performance of several serological assays to discriminate chronically infected patients from patients without schistosomiasis. Only the discriminative tests are displayed.

Assay	AUC (95% CI)	Cut-off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	LR+	LR-
SWAP	0.905 (0.809-0.962)	0.245	92.6 (82.1-97.9)	78.6 (49.2-95.1)	4.32	0.09
SEA IgG	0.720 (0.598-0.822)	0.404	74.1 (60.3-85.0)	64.3 (35.2-87.1)	2.07	0.40

AUC, area under the ROC curve; 95% CI, 95% confidence interval; LR+, likelihood ratio for a positive result; LR-, likelihood ratio for a negative result.



Table 4. Performance of several serological assays to discriminate schistosomiasis (both acutely and chronically infected) from patients without schistosomiasis. Only the discriminative tests are displayed.

Assay	AUC (95% CI)	Cut-off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	LR+	LR-
SWAP	0.931 (0.871-0.969)	0.245	94.4 (88.3-97.9)	78.6 (49.2-95.1)	4.41	0.07
IgG						
SEA IgG	0.784 (0.701-0.853)	0.404	84.4 (76.2-90.6)	64.3 (35.2-87.1)	2.36	0.24

AUC, area under the ROC curve; 95% CI, 95% confidence interval; LR+, likelihood ratio for a positive result; LR-, likelihood ratio for a negative result.

## References

- Alves-Brito,CF, Simpson,AJG, Bahia-Oliveira,LMG, Rabello,ALT, Rocha,RS, Lambertucci,JR, Gazzinelli,G, Katz,N, Correia-Oliveira,R. (1992). Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 86: 53-56.
- Barbosa,CS, Domingues,AL, Abath,F, Montenegro,SM, Guida,U, Carneiro,J, Tabosa,B, Moraes,CN, Spinelli,V. (2001a). Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 17: 725-728.
- Barbosa,CS, Montenegro,SM, Abath,FG, Domingues,AL. (2001b). Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96 Suppl: 169-172.
- Beck,L, Van-Lume,DS, Souza,JR, Morais,CN, Melo,WG, Xavier,E, Barbosa,CS, Aroucha,ML, Domingues,AL, Favre,TC, Pieri,OS, Abath,FGC, Montenegro,SML. (2004). Evaluation of tests based on the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99 (Suppl. I): 97-98.
- Boros,DL and Warren KS. (1970) Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. Journal of Experimental Medicine 132: 574-578.
- Bottieau,E, Clerinx,J, de Vega,MR, Van den Enden,E, Colebunders,R, Van Esbroeck,M, Vervoort,T, Van Gompel,A, Van den Ende,J. (2006). Imported Katayama fever: Clinical and biological features at presentation and during treatment. Journal of Infection 52: 339-345.
- Gryseels,B, Polman,K, Clerinx,J, Kestens,L. (2006). Human schistosomiasis. The Lancet 368: 1106-1118.
- Makarova,E, Goes,TS, Leite,MF, Goes,AM. (2005). Detection of IgG binding to *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26 is a sensitive and specific method for acute schistosomiasis diagnosis. Parasitology International 54: 69-74.
- Mansour,MM, Ali,PO, Farid,Z, Simpson,AJG, WOODY,JW. (1989). Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responded to keyhole limpet hemocyanin. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41: 338-344.
- Oliveira,EJ, Kanamura,HY, Dias,LCS, Soares,LCB, Lima,DM, Akman,L. (2003). Elisa-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. Cadernos de Saúde Pública 19: 255-261.
- Sackett,DL, D J Haynes, G H Guatt, P Tugwell, 1991, Clinical Epidemiology. A basic science for clinical medicine, Boston, Little Brown and Company, p. 1-185.

- Thors,C, Linder,E. (1998). Cross reacting antibodies against keyhole limpet haemocyanin may interfere with the diagnostics of acute schistosomiasis. *Parasite Immunology* 20: 489-496.
- Valli,LCP, Kanamura,HY, Silva,RM, Ribeiro-Rodrigues,R, Dietze,R. (1999). Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 302-307.
- Valli,LCP, Kanamura,HY, Silva,RM, Silva,MIPG, Velloso,SAG, Garcia,ET. (1997). Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of and serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57: 358-362.
- Verweij,JJ, Polderman,AM, Visser,LG, Deelder,AM. (1995). Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 48-50.

