

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA  
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM UMA ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE  
NO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

**por**

**Liliane Maria Vidal Siqueira**

**Belo Horizonte**

**Março/ 2011**

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA ESQUISTOSSOMOSE  
MANSONI EM UMA ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE NO MUNICÍPIO DE  
MONTES CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

**por**

**Liliane Maria Vidal Siqueira**

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

**Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**

**Co-orientação: Dr. Martin Johannes Enk**

**Belo Horizonte**

**Março/ 2011**

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

S619a Siqueira, Liliane Maria Vidal  
2011

Avaliação de métodos diagnósticos para esquistossomose mansoni em uma área de baixa endemicidade no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil / Liliane Maria Vidal Siqueira – Belo Horizonte, 2011.

XXI, 85 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 96 - 106

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

1. Esquistossomose mansoni/diagnóstico 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Doenças Endêmicas/prevenção & controle I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Enk, Martin Johannes

CDD – 22. ed. – 616.963

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA ESQUISTOSSOMOSE  
MANSONI EM UMA ÁREA DE BAIXA ENDEMICIDADE NO MUNICÍPIO DE  
MONTES CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

**por**

**Liliane Maria Vidal Siqueira**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)**

**Prof. Dr. George Luiz Lins Machado Coelho**

**Prof. Dr. Stefan Michael Geiger**

**Suplente: Neusa Araújo Pereira**

**Dissertação defendida e aprovada em: 30 / 03 / 2011**

*“A felicidade às vezes é uma benção – mas geralmente é uma conquista. Vamos sofrer, vamos ter momentos difíceis, vamos enfrentar muitas decepções – mas tudo é passageiro, e não deixa marcas. E, no futuro, podemos olhar para trás com orgulho e fé.”*

(Paulo Coelho)

Dedico este trabalho a minha querida mãe Izabel e ao meu saudoso pai Francisco, que mesmo em outro plano, continua a olhar por mim. Pai, o seu brilho continua em mim! Ao Thiago, pelo amor e incentivo constante.

## **Agradecimentos**

A Deus, por guiar meus passos e ser luz no meu caminho.

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

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

À minha mãe, dedico este trabalho. Peço desculpas pela ausência em casa, sei que suas orações foram o que me deram força.

À minha família pelo carinho e meus sobrinhos pelos momentos de alegrias.

Ao Thiago, pelo companheirismo, carinho e amor. Obrigada pela sua compreensão e incentivo constante. À sua família por me acolher, obrigada!

Ao meu orientador Dr. Paulo Marcos Zech Coelho. Obrigada pela oportunidade dada no Laboratório de Esquistossomose. O senhor é um exemplo de ética na pesquisa, além de ser compreensivo e humano. Obrigada por todos os ensinamentos!

Ao Dr. Martin Johannes Enk, meu co-orientador! Sua orientação foi imprescindível para o meu crescimento intelectual, este trabalho é fruto de seus ensinamentos. Muito obrigada!

Ao Dr. Cristiano Lara Massara, pela mobilização da população. Você tem um jeito único de lidar com as pessoas. Adorei a convivência nos trabalhos de campo.

Ao Áureo Almeida de Oliveira, meu amigo e companheiro de trabalho de campo. Aprendi com você que não há barreiras quando se quer vencer, esta dissertação é

sua também. Você não mediu esforços para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigada!

A Dra. Luciana Gomes, pela colaboração na realização da PCR-ELISA, pela sua disponibilidade e ajuda. Ao Samuel pela valiosa ajuda na execução da técnica e a todos do Laboratório de Pesquisas Clínicas pela receptividade.

Ao Dr. Ricardo Guimarães pela realização do geoprocessamento.

Ao Dr. George Luiz Lins Machado Coelho, meu orientador da Iniciação Científica, muito do que sou hoje cientificamente, foi por sua influência, muito obrigada! Ao pessoal do antigo LEPI (Laboratório de Epidemiologia-UFOP), saudades!

A todos do LESQ (Laboratório de Esquistossomose), não poderia ter escolhido laboratório melhor. Vocês são únicos!

À Ana Karine pela amizade e ajuda valiosa nas ELISAs, aprendi muito com você.

Ao Watson, amigo e companheiro de experimentos. Você foi essencial neste trabalho. Muito obrigada mesmo.

À Ana Carolina, pela amizade, pelos conselhos, caronas e pela preciosa ajuda na formatação da dissertação.

Eu teria um agradecimento especial a cada um de vocês, mas para não me alongar agradeço a todos pela amizade: Andrea, Babá, Cinthia, Clarice, Daisy, Elisandra, Flávia, Gardênia, Juliano, Jussara, Kika, Lucila, Ludmila, Dr. Naftale, Neusa, Patrícia, Rafaella, Suedali, Tatiana, Vandinha, Vanessa, D. Vera e Wander.

À Anna Carolina Lustosa Lima pelas análises estatísticas.

À População de Pedra Preta, em especial Célia, Sr. Valdir, Cida, Rayane e Ramone que nos ajudaram na área.



Aos técnicos do Centro de Controle de Zoonoses/Montes Claros que confeccionaram as lâminas de Kato-Katz. Em especial Sr. José, Alfredo e Joaquim.

À Nidia Francisca Figueiredo pelo apoio disponibilizado em Montes Claros.

À Ana Carolina Marinho pela amizade e pela boa convivência nestes 2 anos em que moramos juntas.

## **Apoio Financeiro**

Agradeço à Instituição financiadora FAPEMIG pela concessão de uma bolsa de estudos durante o curso, à FIOCRUZ e ao CPqRR pela infra-estrutura, suporte técnico e material disponibilizado.

## Sumário

Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvi
Lista de Gráficos.....	xviii
Lista de Abreviaturas.....	xix
Resumo.....	xx
Abstract.....	xxi
1 Introdução.....	22
1.1 Epidemiologia da doença.....	22
1.1.1 A Esquistossomose no mundo.....	22
1.1.2 A Esquistossomose no Brasil.....	24
1.1.3 A Esquistossomose no estado de Minas Gerais.....	26
1.2 Ciclo biológico.....	27
1.3 A doença.....	29
1.4 Controle.....	30
1.5 Tratamento Específico e Controle de Cura.....	34
1.6 Métodos Diagnósticos.....	35
1.6.1 Métodos parasitológicos.....	35
1.6.1.1 Método Kato-Katz.....	37
1.6.1.2 Método de TF-Test®.....	38
1.6.2 Métodos imunológicos.....	39
1.6.3 Métodos moleculares.....	40
1.6.3.1 PCR-ELISA.....	41
2 Justificativa.....	42
3 Objetivos.....	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4 Considerações éticas.....	44
5 Material e Métodos.....	45
5.1 Área de estudo.....	45
5.2 População de Estudo.....	47
5.3 Coleta de dados.....	47
5.3.1 Exame parasitológico de fezes.....	47

5.3.1.1	Método de Kato-Katz (Katz <i>et al.</i> , 1972).....	47
5.3.1.2	Método de TF-Test®.....	49
5.3.2	Método Molecular.....	51
5.3.2.1	Método PCR-ELISA (Gomes <i>et al.</i> , 2010).....	51
5.3.3	Tratamento e Controle de Cura.....	54
5.3.4	Intensidade de infecção.....	54
5.4	Análise estatística.....	54
5.4.1	Prevalência e Taxa de Positividade.....	55
5.4.2	“Padrão Ouro”.....	55
5.4.3	Parâmetros estatísticos utilizados na validação de métodos diagnósticos.....	55
5.4.4	Concordância Diagnóstica.....	56
5.5	Geoprocessamento.....	56
6	Resultados.....	57
6.1	Prevalência da esquistossomose.....	57
6.2	Método de Kato-Katz.....	57
6.2.1	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> com uma lâmina.....	57
6.2.2	Efeito do aumento do número de lâminas de uma única amostra na taxa de positividade e sensibilidade da técnica na detecção da infecção com <i>S. mansoni</i> .....	57
6.2.3	Varição na detecção de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> entre lâminas de uma mesma amostra.....	58
6.2.4	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando 12 lâminas de uma única amostra.....	59
6.2.5	Avaliação da taxa da positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando uma lâmina da 1ª, 2ª, 3ª amostra (3 lâminas de 3 amostras).....	59
6.2.6	Avaliação da taxa da positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando 2 lâminas da 1ª, 2ª, 3ª amostra (6 lâminas de 3 amostras).....	60
6.2.7	Avaliação da taxa da positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando 2 lâminas da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª amostra (8 lâminas de 4 amostras).....	60
6.2.8	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> com 12 lâminas da primeira amostra, 2 lâminas da 2ª, 3ª e 4ª amostra (18 lâminas de 4 amostras).....	61

---

6.2.9	Avaliação do efeito do aumento do número de amostras na taxa da positividade e sensibilidade da técnica de Kato-Katz na detecção da infecção por <i>S. mansoni</i> .....	61
6.3	Técnica de TF-TEST® .....	62
6.3.1	Avaliação da detecção da infecção com <i>S. mansoni</i> em 1500mg de 3 amostras de fezes .....	62
6.4	Avaliação comparativa entre os métodos TF-Test® e Kato-Katz.....	63
6.4.1	Comparação direta utilizando 500mg de fezes da mesma amostra utilizando os métodos de Kato-Katz e TF-Test®.....	63
6.4.2	Comparação entre o método de TF-TEST® utilizando 1500 mg provenientes de 3 amostras e a técnica de Kato-Katz examinando 6 lâminas de 3 amostras.....	63
6.4.3	Comparação entre o método de TF-TEST® utilizando 1500 mg de 3 amostras e a técnica de Kato-Katz examinando 3 lâminas de 3 amostras.....	64
6.4.4	Comparação entre o método de TF-TEST® utilizando 1500 mg de 3 amostras e a técnica de Kato-Katz examinando 12 lâminas da mesma amostra.....	65
6.5	Diagnóstico Molecular – Técnica de PCR-ELISA .....	65
6.5.1	Avaliação da taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> utilizando a técnica de PCR-ELISA em uma amostra fecal de 500mg em relação ao “Padrão Ouro” .....	65
6.5.2	Avaliação comparativa entre os métodos Kato-Katz e PCR-ELISA em relação à mesma amostra de fezes examinada .....	66
6.6	Concordância dos métodos diagnósticos coproscópicos e molecular com o Padrão Ouro .....	67
6.7	Síntese dos resultados de sensibilidade e prevalência dos três métodos diagnósticos .....	68
6.8	Intensidade de infecção .....	69
6.9	Prevalências de geohelminhos e protozoários intestinais.....	69
6.10	Controle de cura.....	70
6.10.1	Controle de cura 30 dias após o tratamento.....	70
6.10.2	Controle de cura 90 dias após o tratamento.....	71
6.10.3	Controle de cura 180 dias após o tratamento.....	71
6.11	Prevalência por faixa etária, gênero e localidade .....	72
6.11.1	Correlação entre faixa etária e prevalência de esquistossomose ....	72

6.11.2	Comparação da proporção de indivíduos positivos com uma lâmina de Kato-Katz e com o “Padrão Ouro” em relação à faixa etária .....	73
6.11.3	Correlação entre gênero dos participantes e a prevalência de esquistossomose de acordo com Padrão Ouro .....	74
6.11.4	Correlação entre localidade e a prevalência de esquistossomose de acordo com Padrão Ouro .....	75
6.12	Geoprocessamento da área .....	77
7	Discussão .....	81
8	Considerações finais .....	89
9	ANEXOS .....	90
9.1	Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa .....	90
9.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	91
9.3	Convite para submissão de artigo no Suplemento da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	95
10	Referências bibliográficas.....	96

---

## Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose. ....	23
Figura 2. Distribuição da esquistossomose na América Latina e Caribe .....	24
Figura 3. Distribuição da esquistossomose no Brasil .....	26
Figura 4. Distribuição da esquistossomose no Estado de Minas Gerais .....	27
Figura 5. Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	28
Figura 6. Controle da esquistossomose no mundo .....	31
Figura 7. Área Rural de Pedra Preta/ Montes Claros- MG .....	45
Figura 8. Área urbana de Pedra Preta/ Montes Claros- MG .....	46
Figura 9. Mapa da área de estudo / Distribuição das residências por localidade.....	46
Figura 10. Entrega do pote coletor para os participantes.....	47
Figura 11. Recebimento das amostras de fezes .....	48
Figura 12. Confeção das lâminas de Kato-Katz .....	49
Figura 13. Aparato do Kit TF-Test®.....	50
Figura 14. Análise do sedimento das fezes em microscópio óptico .....	50
Figura 15. Centrífuga Especial para o Kit TF-Test® .....	50
Figura 16. Etapas da Amplificação / PCR-ELISA.....	52
Figura 17. Etapas da Revelação/PCR-ELISA .....	53
Figura 18. Revelação do PCR em placa de ELISA sensibilizada com estreptoavidina.....	53
Figura 19. Categorias de classificação da doença por métodos diagnósticos	56
Figura 20. Distribuição dos casos de esquistossomose por área.....	77
Figura 21. Distribuição dos casos de infecção por ancilostomídeos por área	78
Figura 22. Distribuição dos casos positivos para <i>Enterobius vermicularis</i> .....	79
Figura 23. Distribuição dos casos positivos para <i>Trichuris trichiura</i> .....	80

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Taxa de positividade de uma lâmina de KK em relação ao “Padrão Ouro” .....	57
Tabela 2. Taxa de positividade acumulada e sensibilidade decorrente do aumento de número das lâminas analisadas da primeira amostra .....	58
Tabela 3. Taxa de positividade para <i>Schistosoma mansoni</i> e sensibilidade encontradas para cada uma das 12 lâminas da primeira amostra examinada .....	58
Tabela 4. Taxa de positividade de doze lâminas de Kato-Katz em relação ao “Padrão Ouro” .....	59
Tabela 5. Taxa de positividade de três lâminas de Kato-Katz de 3 amostras em relação ao “Padrão Ouro” .....	59
Tabela 6. Taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando seis lâminas de Kato-Katz de 3 amostras em relação ao “Padrão Ouro” .....	60
Tabela 7. Taxa de positividade para infecção com <i>S. mansoni</i> examinando oito lâminas de Kato-Katz de 4 amostras em relação ao “Padrão Ouro” .....	60
Tabela 8. Taxa de positividade de 18 lâminas de Kato-Katz de 4 amostras em relação ao “Padrão Ouro” .....	61
Tabela 9. Efeito do aumento no número de lâminas examinadas pelo método de Kato-Katz na sensibilidade da técnica e taxa de positividade para esquistossomose .....	62
Tabela 10. Taxa de positividade do TF-Test® em relação ao “Padrão Ouro” .....	62
Tabela 11. Comparação direta (500mg) entre Kato-Katz e TF Test® .....	63
Tabela 12. Comparação da positividade obtida pelos métodos TF-Test® - 1500mg de 3 amostras - e Kato-Katz - 6 lâminas de 3 amostras (duas lâminas de cada) .....	64
Tabela 13. Comparação da positividade obtida pelos métodos TF-Test® - 1500mg de 3 amostras - e Kato-Katz - 3 lâminas de 3 amostras (1 lâmina de cada) .....	64
Tabela 14. Comparação da positividade obtida pelos métodos TF-Test® - 1500mg de 3 amostras - e Kato-Katz - 12 lâminas de uma amostra – 500mg .....	65
Tabela 15. Taxa de Positividade da PCR-ELISA em relação ao “Padrão Ouro” .....	66



---

Tabela 16. Comparação entre os métodos PCR-ELISA e Kato-Katz examinando 12 lâminas de uma amostra.....	66
Tabela 17. Comparação entre os métodos PCR-ELISA e Kato-Katz examinando uma lâmina .....	67
Tabela 18. Concordância diagnóstica dos diferentes métodos em relação ao Padrão Ouro, utilizando o índice kappa (k) .....	68
Tabela 19. Sensibilidade e prevalência entre os métodos diagnósticos Kato-Katz, PCR-ELISA e TF-Test® .....	68
Tabela 20. Comparação da carga parasitária encontrada pelas técnicas TF-Test® e Kato-Katz (18 lâminas) .....	69
Tabela 21. Prevalência de helmintos intestinais entre os 201 participantes das duas localidades trabalhadas .....	70
Tabela 22. Taxa de cura para esquistossomose observada 30 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato–Katz e TF-Test® .....	71
Tabela 23. Taxa de cura para esquistossomose observada 90 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato–Katz e TF-Test® .....	71
Tabela 24. Taxa de cura para esquistossomose observada 180 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato–Katz e TF-Test® .....	72
Tabela 25. Número de positivos para esquistossomose, por gênero, na população das localidades estudadas.....	75

## Lista de Gráficos

Gráfico 1. Prevalência da esquistossomose relacionada com a faixa etária ..	73
Gráfico 2. Comparação da proporção de indivíduos positivos com uma lâmina de Kato-Katz de uma única amostra com o Padrão Ouro em relação a faixa etária.	74
Gráfico 3. Prevalência da esquistossomose por gênero na população das duas áreas trabalhadas.....	75
Gráfico 4. Prevalência da esquistossomose nas localidades de Buriti Seco (BS) e Morro Grande (MG) obtida pelo Padrão Ouro .....	76

## Lista de Abreviaturas

KK – Kato-Katz

$L_N A_N$  – Número de lâminas e número de amostras

DALY - Disability-adjusted life year

GIS – Sistema de Informação Geográfica

PZQ – Praziquantel

OXA – Oxaminiquina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

SEA – Soluble egg antigen

SWAP – Soluble worm adult provenient

TF-Test® - Three Fecal Test

## Resumo

Este estudo populacional, baseado na avaliação de dois métodos parasitológicos e um método molecular para o diagnóstico da esquistossomose mansoni foi realizado numa área de baixa transmissão na localidade de Pedra Preta, Montes Claros- MG. Um total de 201 pessoas participou desta pesquisa, todas moradoras da área rural desta localidade. Quatro amostras de fezes foram obtidas de todos participantes e analisadas utilizando o método Kato-Katz (12 lâminas da primeira, duas da segunda, terceira e quarta amostra, totalizando 18 lâminas) e o método parasitológico comercial, TF-Test®, o qual foi realizado de forma quantitativa. Além disso, a técnica de PCR-ELISA foi aplicada em 500 mg de fezes na primeira amostra. Os resultados foram analisados comparativamente ao método de Kato-Katz. Todos os positivos para *S. mansoni* foram tratados com praziquantel e os positivos para os outros helmintos tratados com albendazol. Para avaliação de cura após o tratamento, os positivos foram acompanhados 30, 90 e 180 dias após o tratamento, pelas duas técnicas parasitológicas. A análise dos dados envolveu determinação da prevalência, sensibilidade dos métodos diagnósticos, carga parasitária e definição de um “Padrão Ouro”, consistindo da soma de todas as amostras e lâminas examinadas pelo método de Kato-Katz e pelo método de TF-Test®. Os resultados mostraram na comparação da prevalência obtida com uma única lâmina pelo método de Kato-Katz (metodologia adotada pelos programas de controle da doença no Brasil) e com o “Padrão Ouro”, um aumento da taxa de positividade de 8,0% para 35,8% na população, ou seja, um aumento de 4,5 vezes neste índice. Isto indica que a prevalência da esquistossomose obtida com uma lâmina de Kato-Katz, está sendo significativamente subestimada em áreas consideradas de baixa transmissão. O método de PCR-ELISA detectou 36 (18,0%) positivos, um número maior que o obtido por 12 lâminas de Kato-Katz que identificou 29 (14,4%), examinando fezes da mesma amostra. Assim, a combinação de metodologias que revelem resultados mais próximos da prevalência real da esquistossomose se torna de extrema importância em inquéritos epidemiológicos que visam à interrupção da transmissão. Em nosso estudo a taxa de reinfeção após o tratamento foi muito baixa (1,5%), o que demonstra que uma prospecção da infecção intensa é mais efetiva e pode prevenir sucessivos tratamentos.

**Abstract**

This population study, based on the evaluation of two parasitological methods and one molecular biological technique for the diagnosis of schistosomiasis mansoni was carried out in a low transmission area in Pedra Preta, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. A total of 201 inhabitants of the rural area participated in this research. Four stool samples were obtained from all participants and analyzed according to the Kato-Katz method (12 slides of the first, 2 of the second, the third and fourth sample, summing up 18 slides) and a commercial test, the TF-Test, which was performed quantitatively. Furthermore the technique of PCR-ELISA was applied in 500mg stool of the first sample. The results were analyzed in comparison to the Kato-Katz technique. All positives for schistosomiasis were treated with Praziquantel and those for other helminthes with Albendazole. Positive patients were followed up 30, 90, and 180 days after treatment with both parasitological techniques in order to establish the cure rate. The data analysis involved the determination of prevalence, sensitivity of the diagnostic methods, worm burden and the definition of the “gold standard” obtained by summing the results of all samples examined by the Kato-Katz technique and the TF-Test®. The results show that the prevalence obtained by examination of one Kato-Katz slide (the methodology adopted by the Brazilian control program) in comparison to the “gold standard” rises from 8.0% to 35.8%, which is a 4.5 fold increase. This indicates that the prevalence of schistosomiasis in so called low transmission areas is significantly underestimated. The PCR-ELISA technique detected 36 (18.0%) positives, which is more than those 29 (14.4%) identified by 12 Kato-Katz slides examining the same stool sample. Therefore the combination of different techniques that reveals results closer to the real prevalence of schistosomiasis gains paramount importance, whenever transmission control is the focus. This study also shows a low rate of re-infection (1.5%), which indicates that an in depth diagnostic survey is more effective and probably may prevent successive treatments.

## 1 Introdução

A esquistossomose é uma doença grave, de evolução crônica, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, subclasse Digenea. Existem cinco espécies que infectam frequentemente o homem: *S. mansoni* (Sambon, 1907), *S. haematobium* (Bilharz, 1852), *S. intercalatum* (Fischer, 1934), *S. japonicum* (Katsurada, 1904) e *S. mekongi* (Voge, Brickner & Bruce, 1978).

O caso mais antigo de esquistossomose humana foi identificado por imunodiagnóstico na múmia de um adolescente egípcio infectado por *S. haematobium* que viveu há mais de cinco mil anos (Deelder, 1990). Ovos da mesma espécie foram encontrados em vísceras de múmias egípcias cuja origem remonta de cerca de três mil anos (Ruffer, 1910).

A espécie *S. mansoni* é transmitida por caramujos do gênero *Biomphalaria* e é encontrada nas Américas, no Caribe e na África. *S. haematobium* é transmitido por caramujos do gênero *Bulinus* e causa a esquistossomose urinária na África e Península Arábica. *S. japonicum* é transmitido por caramujos do gênero *Oncomelania* e causa esquistossomose intestinal e hepatossplênica no Japão, China, Filipinas, Indonésia e Sudeste Asiático. *S. intercalatum* e *S. mekongi* tem apenas importância local, o último, no vale do rio Mekongi (Gryseels *et al.*, 2006) (Figura 1).

De todas as espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, somente o *S. mansoni* é encontrado nas Américas. Acredita-se, que foi introduzido no continente durante o tráfico de escravos. Pelos conhecimentos disponíveis sobre o ciclo vital dos parasitos e sua distribuição geográfica no mundo, sabe-se que outras espécies não são aqui encontradas devido à inexistência de hospedeiros susceptíveis à infecção. No Brasil, foram encontradas naturalmente infectadas as espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848) (Paraense, 1975).

### 1.1 Epidemiologia da doença

#### 1.1.1 A Esquistossomose no mundo

No mundo estima-se que cerca de 200 a 300 milhões de pessoas encontram-se infectadas por pelo menos uma das cinco espécies de *Schistosoma*. Sendo 120 milhões de pessoas sintomáticas e 20 milhões acometidas com a forma grave da

doença (Chitsulo *et al.*, 2000). Aproximadamente 779 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença (Steinmann *et al.*, 2006) e 280.000 mortes por ano são atribuídas a doença e suas complicações (Van der Werf *et al.*, 2003).

A doença é endêmica em 76 países e territórios (Engels *et al.*, 2002) distribuídos pela África, Oriente Médio, América do Sul, Caribe, Filipinas e Sudeste Asiático. Como consequência de programas de controle efetivos baseados no uso de moluscicidas químicos, quimioterapia em larga escala ou seletiva e medidas sanitárias, a prevalência da esquistossomose foi consideravelmente reduzida em áreas endêmicas da América e Ásia. Esta não tem sido a situação na África subsaariana onde a prevalência e a morbidade devido à esquistossomose continuam altas (WHO, 2005).

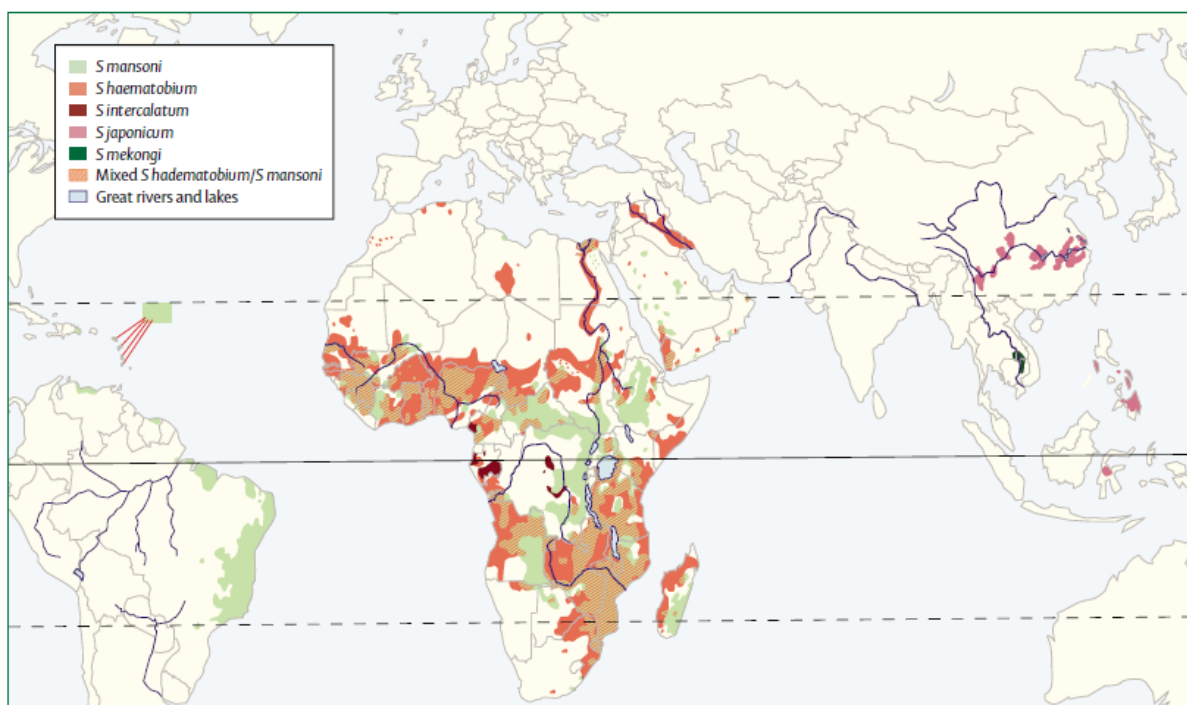


Figura 1. Distribuição global da esquistossomose. Fonte: Gryseels *et al.*, 2006

Na América Latina a esquistossomose pode ser encontrada no Brasil, na ilha de Santa Lucia, no Suriname e na Venezuela. Não há evidência da presença da doença nos últimos 10 anos em Porto Rico e na República Dominicana. Das 570 unidades administrativas da América Latina, 39 já registraram a doença. No Caribe, a incidência da esquistossomose foi reduzida significativamente, apresentando, inclusive, indícios de sua eliminação (Schneider *et al.*, 2011) (Figura 2).

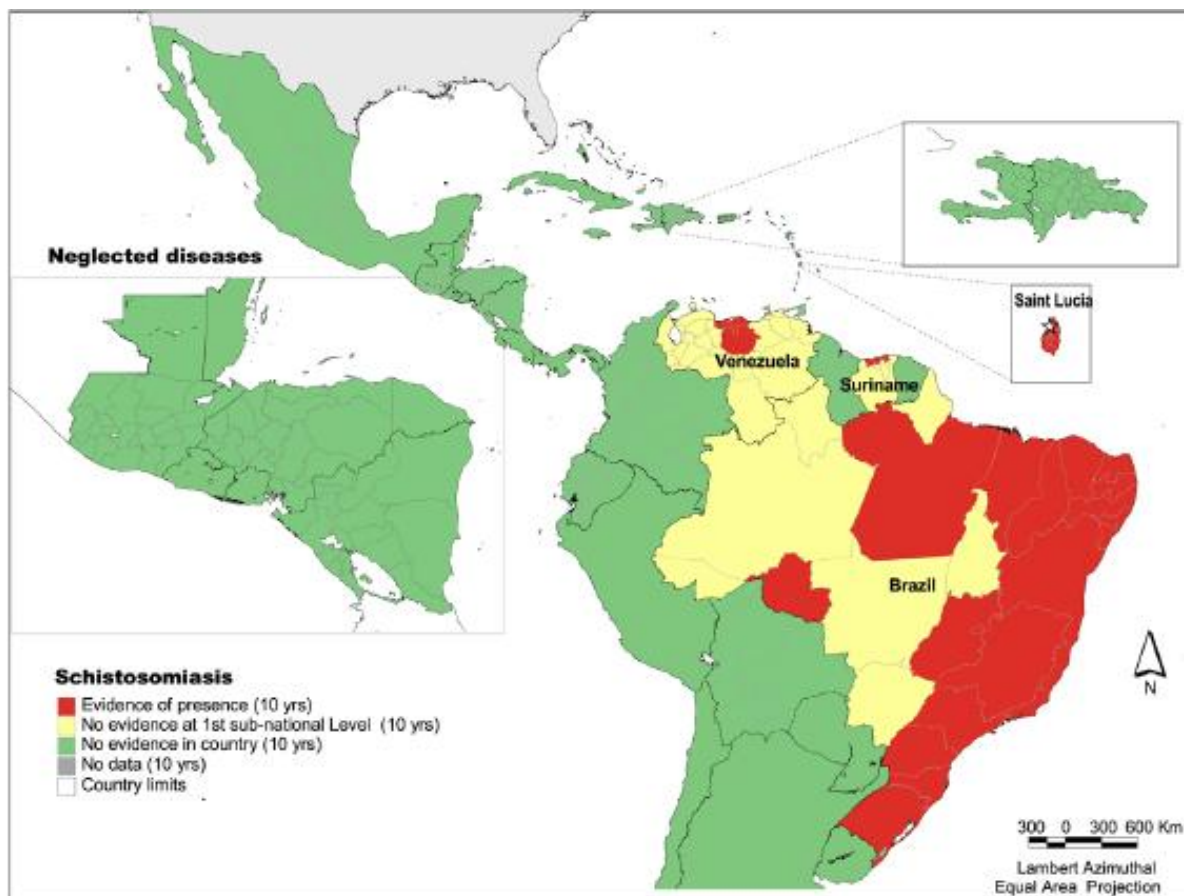


Figura 2. Distribuição da esquistossomose na América Latina e Caribe. Fonte: Schneider et al., 2011

### 1.1.2 A Esquistossomose no Brasil

A introdução da esquistossomose no Brasil se deu a partir de meados do século XVI, com o ingresso de populações africanas devido ao tráfico de escravos como mão de obra para a atividade agrícola canavieira no Nordeste. Nesta região, o fator determinante para a instalação da transmissão foi a presença de espécies de planorbídeos como hospedeiros do parasito. A migração interna causou a dispersão da esquistossomose para novas áreas (Silveira, 1989).

Estima-se que, no Brasil, 25 milhões de pessoas estejam expostas à infecção por *S. mansoni* (Chitsulo *et al.*, 2000). Katz & Peixoto (2000), utilizando dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimaram que existiam no Brasil 7,1 milhões de esquistossomóticos em 1996 e 6,3 milhões em 1997.



Atualmente, a transmissão da esquistossomose ocorre em uma vasta área endêmica, do Maranhão ao Espírito Santo. Ocorre em 19 estados, existindo focos isolados no Distrito Federal, nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Relatos de casos importados de área endêmica são registrados em quase todo território nacional, principalmente em estados considerados pontos de migração como Rondônia (Coura e Amaral, 2004) (Figura 3).

Pode-se observar que a doença tem distribuição heterogênea sendo que, os estados de Minas Gerais e Bahia registram as maiores áreas endêmicas, e os municípios que possuem os níveis de prevalência mais altos estão distribuídos pela região litorânea do Nordeste, principalmente no estado da Bahia e Pernambuco, e na região Sudeste, em Minas Gerais.

No Estado de São Paulo, a introdução da esquistossomose é atribuída a migrações provenientes das áreas endêmicas do nordeste e leste brasileiro, sendo que os primeiros casos autóctones no Estado foram relatados em Santos, em 1923, e no Vale do Paraíba, em 1955 (SUCEN, 1982).

Apesar da redução da morbidade (formas graves) devido ao uso da quimioterapia em larga escala, esta parasitose continua a constituir importante problema de saúde pública no Brasil, tendo em vista seu potencial de expansão. Observa-se ampliação de sua área de transmissão, com o surgimento de focos de esquistossomose em áreas antes consideradas indenes (Gargioni *et al.*, 2008), como aqueles descritos por Graeff-Teixeira *et al.*, (1999) no Rio Grande do Sul.

Dados epidemiológicos da doença são escassos e necessitam ser reavaliados, já que a situação atual é caracterizada pelo decréscimo de altas prevalências, ampliação da área geográfica e de transmissão associada a mudanças sócio-ambientais (Enk *et al.*, 2007).

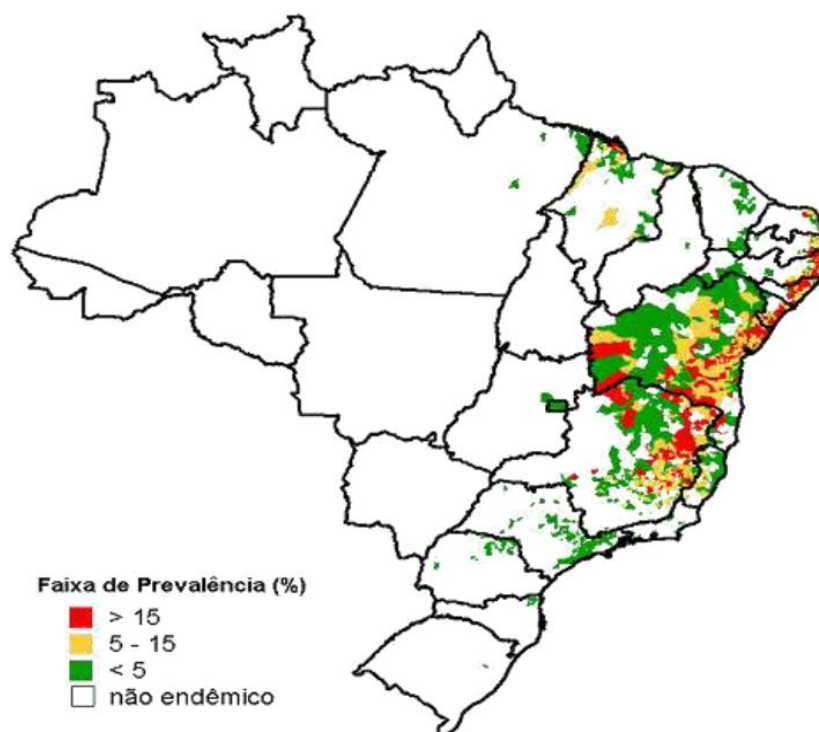


Figura 3. Distribuição da esquistossomose no Brasil. Fonte: Amaral et al., 2006

### 1.1.3 A Esquistossomose no estado de Minas Gerais

A dispersão da esquistossomose para Minas Gerais ocorreu provavelmente no início do século XVIII com a migração em larga escala de escravos, durante o ciclo do ouro e do diamante. Esta mão de obra era proveniente do Nordeste do país, onde a produção açucareira estava em declínio (Carvalho *et al.*, 1987).

Neste estado, a distribuição da esquistossomose é irregular, intercalando-se áreas de maior prevalência com outras onde a transmissão é baixa ou nula. A doença é endêmica nas regiões Norte (Médio São Francisco e Itacambira), Oriental e Centro (Alto Jequitinhonha, Metalúrgica, Oeste e Alto São Francisco). Os maiores índices de prevalência são encontrados nas regiões Nordeste e Leste do Estado, que compreendem os vales do Mucuri, Rio Doce e Zona da Mata, variando de 25 a 75% o que mostra sua importância do ponto de vista epidemiológico (Katz & Carvalho, 1983). Minas Gerais possui 853 municípios e a esquistossomose está presente em 519 deles (Drummond *et al.*, 2006). Segundo dados oficiais, aproximadamente 12 milhões de habitantes estão sob risco da doença e um número estimado de 1 milhão de infectados em uma área de 300.000 km<sup>2</sup>. A região sul do estado (com exceção de Itajubá) e o Triângulo Mineiro, nordeste de Minas Gerais (com exceção de Araxá) são áreas não-endêmicas (Katz, 1998) (Figura 4).

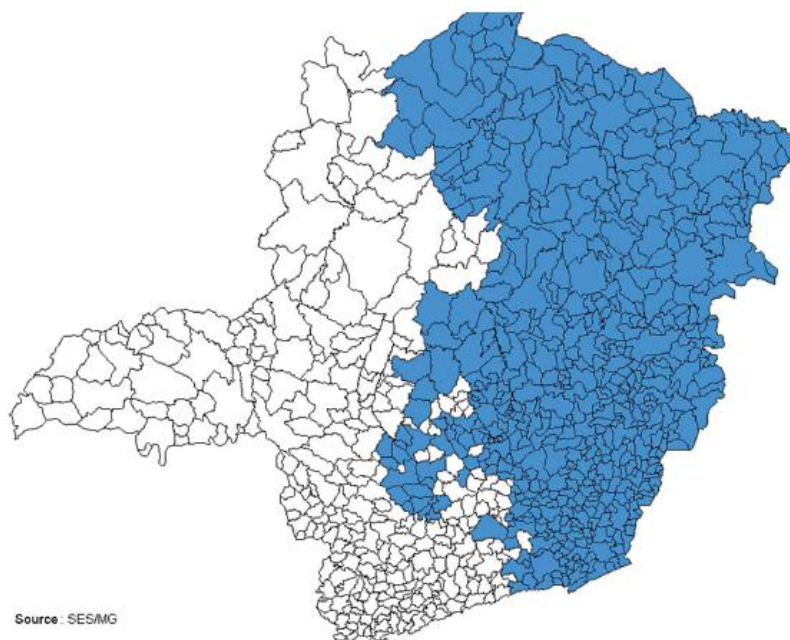


Figura 4. Distribuição da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. Fonte: Drummond et al., 2006

## 1.2 Ciclo biológico

A presença de moluscos suscetíveis e condições ecológicas tais como habitat ideal para a reprodução dos mesmos, bem como o contato freqüente da população humana com coleções de água doce contaminadas favorecem o ciclo evolutivo do parasito. As cercárias liberadas por estes moluscos penetram a pele e/ou mucosa do homem quando em contato com águas contendo esta forma larval do parasito. No processo da penetração, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos, que permanecem na pele por até três dias e depois atingem a circulação venosa, alcançando o coração e pulmões. A migração para o sistema porta se processa pela via sanguínea onde atingem o fígado. No fígado, as formas jovens crescem alimentando-se de sangue e globulinas do hospedeiro utilizando a glicólise anaeróbica, diferenciam-se sexualmente, acasalam-se e migram para as veias mesentéricas inferiores do intestino. Os vermes adultos são dióicos, ou seja, apresentam sexos separados. O corpo do macho é esbranquiçado, medindo cerca de 7–20 mm de comprimento, duas ventosas terminais, um tegumento complexo, trato digestivo fechado e um canal ginécóforo que abriga a fêmea que é longa e fina (Gryseels *et al.*, 2006). A postura de ovos se inicia em torno do 35º dia após infecção. Metade dos ovos fica retida no tecido do hospedeiro, causando a patologia desta doença e a outra metade é eliminada nas fezes. Os ovos ao atingirem o

ambiente aquático, são influenciados pela osmolaridade do meio, por estímulos luminosos e pela temperatura ambiente, o que leva a intensos movimentos da larva, provocando a ruptura transversal da casca do ovo e permitindo assim a eclosão do miracídio. Após a eclosão, esta forma larval tem um tempo de vida de cerca de 8 horas para penetrar nos tecidos dos moluscos hospedeiros. Assim o que favorece o encontro da larva com seu hospedeiro-alvo são aspectos comportamentais (fototropismo positivo) e químicos (substâncias liberadas pelos caramujos) (Coelho *et al.*, 2008). No interior do caramujo, o miracídio se multiplica assexuadamente em esporocistos multicelulares, transformando-se em esporocisto primário e em seguida em esporocisto secundário, do qual se originam as cercárias, podendo um caramujo em sua vida útil eliminar 300 mil cercárias. Estas deixam o caramujo 4 a 6 semanas após a infecção e nadam por até 72 horas até encontrar o hospedeiro definitivo completando assim o ciclo biológico (Gryseels *et al.*, 2006) (Figura 5).

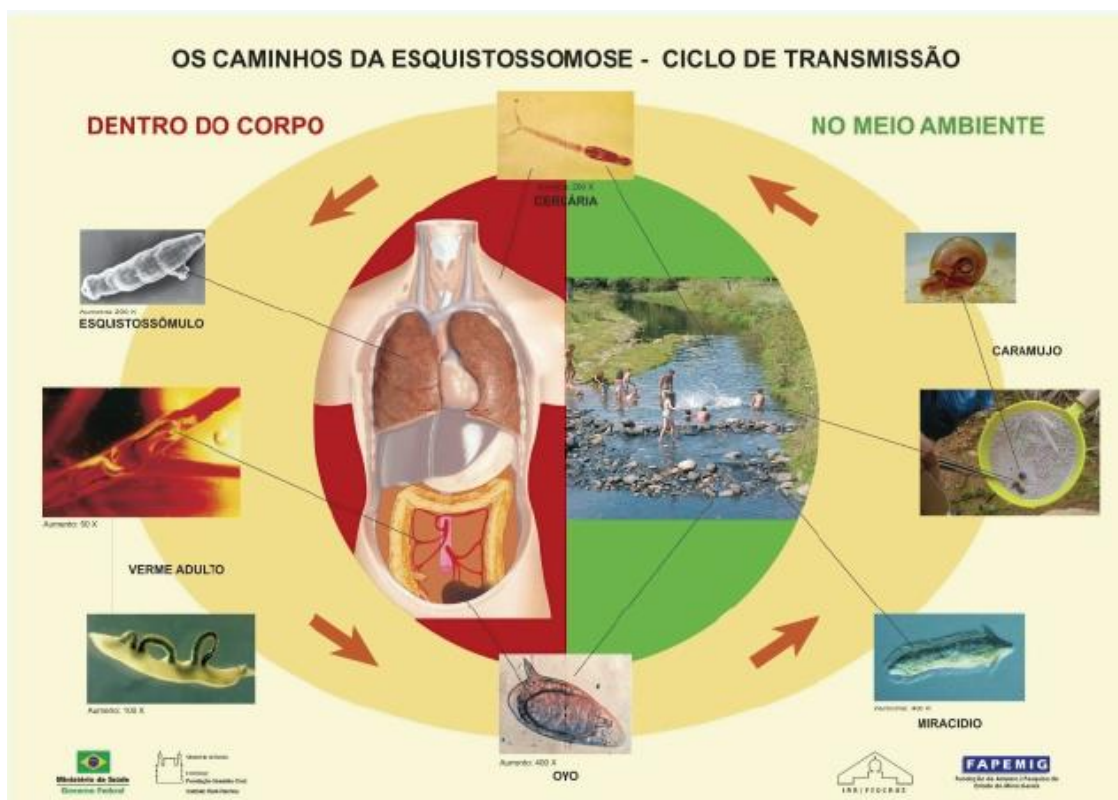


Figura 5. Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Schall et al., 2007 – Cartilha: Os caminhos da Esquistossomose dentro do nosso corpo

### 1.3 A doença

A carga parasitária e a resposta imune do hospedeiro são os fatores mais importantes na patologia da esquistossomose. As lesões patológicas surgem de reações inflamatórias ao redor dos ovos do parasito que são retidos nos órgãos do hospedeiro.

A esquistossomose pode se apresentar sob duas formas: aguda e crônica. A fase aguda ocorre como uma manifestação clínica precoce em indivíduos não-imunes expostos a águas contaminadas com cercárias. Pode ser dividida em fase aguda pré-postural e pós-postural. A fase aguda pré-postural inicia-se no momento da penetração das cercárias e termina por volta do 35º dia após a infecção. É caracterizada por coceiras, eritema, estado febril agudo, freqüentemente associada com sintomas pulmonares (tosse e infiltrados pulmonares) e abdominais (dor abdominal e moderada esplenomegalia). Mialgia e eosinofilia também podem compor a clínica da doença (Ross *et al.*, 2007). A fase pós-postural inicia-se por volta do 40ª dia e perdura até o 150º dia após a infecção, e ocorre devido à disseminação miliar de ovos e formação de granulomas com áreas necróticas, caracterizando a forma toxêmica.

O *S. mansoni* parasita o sistema porta e as veias mesentéricas inferiores, podendo ocasionar na fase crônica as seguintes formas clínicas: a intestinal, a hepatointestinal e a hepatoesplênica (compensada ou descompensada). As lesões hepáticas são decorrentes da deposição de ovos no tecido periportal, e as alterações vasculares mais freqüentes no sistema portal são devido à redução e distorção do calibre dos vasos pela pressão dos granulomas. A fibrose portal envolve todo o fígado, observa-se a presença de miofibroblastos decorrente de cicatriz portal de natureza quelóide, sendo esta fibrose reversível, principalmente nas fases iniciais da doença.

A discriminação entre fase aguda e crônica da esquistossomose permite o tratamento precoce e a prevenção de formas ectópicas ou graves da doença (Beck *et al.*, 2008). A neuroesquistossomose é uma complicação ectópica da esquistossomose e ocorre quando o ovo e/ou vermes adultos alcançam as veias do sistema nervoso central (Ferrari *et al.*, 2008). As espécies que tem relato ocasionar esta síndrome no homem são: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*.

O aumento do turismo rural em áreas endêmicas se tornou um fator de risco para a infecção, já que pessoas oriundas de áreas não endêmicas, ou que não

possuem contato prévio com o parasito ficam sujeitas a apresentar as formas mais graves da doença (Enk *et al*, 2004). Isto se deve ao fato destas pessoas não terem desenvolvido ou adquirido um estado de imunoregulação do processo inflamatório granulomatoso em torno dos ovos nos tecidos.

A gravidade dos sintomas e as alterações patológicas associadas com a esquistossomose são bem conhecidas. Porém, os efeitos debilitantes dessas manifestações clínicas não têm sido adequadamente quantificados, especialmente em estudos populacionais que não estimam de forma clara o efeito da esquistossomose crônica no desempenho cognitivo ou na qualidade de vida dos indivíduos infectados (King *et al.*, 2005). A Organização Mundial de Saúde tem usado a estimativa DALY (*Disability-adjusted life-year*) para estabelecer uma medida para os efeitos debilitantes de diferentes doenças. Numa escala global, o número de anos de vida saudáveis perdidos pelas esquistossomoses torna-se grande, estimado em 6-13,5 milhões DALYs, devido ao grande número de pessoas com a doença (King *et al.*, 2006). Para a África Subsaariana, a morbidade devido à esquistossomose tem sido estimada em 3,5 milhões DALYs (Utzinger, 1999).

#### 1.4 Controle

Apesar do amplo conhecimento sobre a doença e toda a experiência acumulada sobre o controle, somente poucos países endêmicos foram capazes de eliminar totalmente a transmissão (WHO, 2005).

O controle da esquistossomose tem progredido nos últimos 20 anos e o mapa epidemiológico está mudando. A eliminação e/ou erradicação da esquistossomose está sendo alcançada nas ilhas do Caribe, Japão e Tunísia. O controle da morbidade e mortalidade tem sido alcançado no Brasil, Camboja, China, Egito, Laos e Filipinas. O controle tem obtido sucesso no Irã, Iraque e Marrocos onde a prevalência da infecção é baixa, embora a transmissão continue (Chitsulo *et al.*, 2000; Engels *et al.*, 2002) (Figura 6).

Por outro lado, atividades ligadas ao desenvolvimento dos recursos hídricos, tais como construção de barragens e a implementação de sistemas de irrigação, bem como os deslocamentos de populações tem disseminado a doença em áreas antes não endêmicas (Gibodat & Bergquist, 2000).

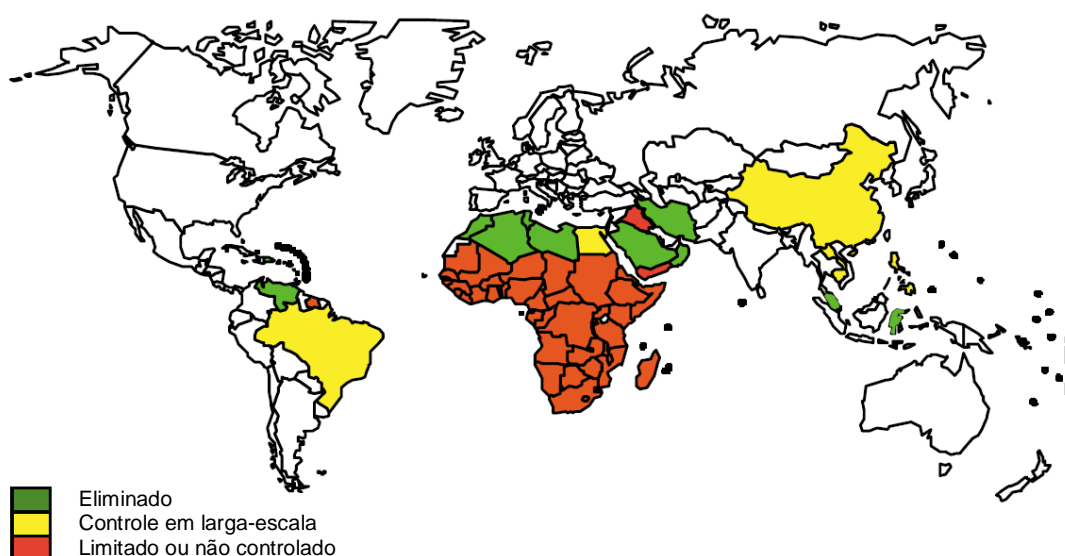


Figura 6. Controle da esquistossomose no mundo. Fonte: Engels et al., 2002

No Brasil, com o advento de medicamentos mais seguros, mais efetivos e de fácil administração foi possível implementar um programa nacional para combater a doença. Em 1975, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose - PECE foi criado pelo Ministério da Saúde. Inicialmente abrangeu somente seis estados do Nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe). Seus objetivos eram audaciosos e incluíam o controle da endemia através da eliminação da transmissão e redução da prevalência a menos de 4% nos seis estados, quimioterapia em massa com oxamniquina, aplicação de moluscicida (niclosamida), saneamento básico, abastecimento de água e educação em saúde em todas as comunidades trabalhadas. Foram feitos tratamentos dos positivos e, em menor escala, aplicação de moluscicida. Saneamento básico e Educação em Saúde foram ações localizadas (Almeida Machado 1982). Por causa da diversidade de metodologias adotadas na implementação do PECE, em diferentes áreas endêmicas a avaliação do programa tornou-se uma tarefa difícil. Admite-se, porém, que o PECE tenha sido efetivo para a redução da morbidade e conseqüentemente da mortalidade causada pela endemia (Lima e Costa *et al.*, 1996).

Em 1980, o PECE foi considerado prioridade e passou a ser chamado Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), com suporte contínuo do governo federal, exclusivamente. Em 1984, o Programa foi estendido para Minas Gerais e Bahia e seus objetivos foram alterados e passaram a ser menos audaciosos: reduzir a prevalência a níveis menores que 25% em áreas de média e



alta prevalências; diminuir os índices de morbidade e de mortalidade; controlar a transmissão em localidades isoladas e impedir o avanço da endemia para áreas indenes. A partir de 1993 o PCE foi descentralizado, sendo atualmente responsabilidade dos municípios executarem as atividades de controle. Os estados coordenarem as atividades municipais, enquanto o governo federal estabelece as normas e providencia suporte material, técnico e financeiro (Amaral, 2006). As atividades de controle exercidas são: a) diagnóstico coproparasitológico pelo método de Kato-Katz, examinando uma lâmina de uma única amostra de fezes; b) tratamento dos portadores da infecção por *S. mansoni*; c) melhorias das condições sanitárias; d) inspeção das coleções de água doce e tratamento com moluscicida (ação pouco empregada atualmente devido à falta de ação seletiva dos produtos químicos utilizados, o que ocasiona toxicidade à fauna e flora aquáticas); e) educação em saúde, atividade que visa conscientização da população sobre o problema da esquistossomose.

O controle da esquistossomose tem dois focos: a redução da transmissão e a redução da ocorrência de formas graves, ou seja, a redução da morbidade (Katz, 1999). Para o controle de morbidade, é necessário que se realize o tratamento dos portadores, que apesar de eficaz não é sustentável, devido às constantes reinfecções dos moradores de áreas endêmicas. Para se atingir o controle da transmissão é necessário o tratamento periódico de portadores da infecção, a ampliação da cobertura de abastecimento de água tratada e esgotamento sanitário, a redução do contato com coleções hídricas contaminadas e o controle de hospedeiros intermediários.

Katz (1986) define áreas de baixa endemicidade como aquelas com prevalência inferior a 10%, com a maioria dos infectados assintomáticos e eliminando menos de 96 ovos por grama de fezes. Segundo Alarcón de Noya *et al.* (2006) uma definição de área de baixa endemicidade deveria incluir fatores tais como a prevalência dos casos de esquistossomose em 25% ou menos da população examinada, a predominância (75% ou mais) de baixa intensidade de infecção, baixa morbidade com predominância de assintomáticos e a presença focal de caramujos *Biomphalaria spp.* susceptíveis.

A força de transmissão é também um conceito importante no entendimento da evolução da doença em uma determinada área. Como consequência de medidas de controle, tais como tratamento específico, saneamento básico e controle de caramujos, a força da transmissão diminui. Com o tratamento repetitivo ao longo do



tempo, as cargas parasitárias diminuem, poucos ovos são eliminados e menos caramujos se infectam e assim eliminam menos cercárias. Logo, a probabilidade de se infectar também diminui.

Em áreas com força de transmissão reduzida, ou de baixa transmissão, a morbidade fica controlada, em conseqüência o diagnóstico clínico é o primeiro parâmetro afetado já que as pessoas infectadas com carga parasitária baixa não manifestam sintomas característicos da doença (Alarcón de Noya *et al.*, 2006). Nestas situações, os métodos diagnósticos atualmente disponíveis também perdem uma proporção significativa de pessoas infectadas. A importância de se diagnosticar pessoas com infecções com baixa carga parasitária se deve a vários fatores, dentre eles, o fato de infecções não-detectadas e não tratadas serem responsáveis pela persistência da transmissão e manutenção da doença na área. Além disso, é cientificamente conhecido que a carga parasitária individual é reduzida de 80 a 90% após o tratamento. Assim, a perda na detecção dos positivos é aumentada em exames subseqüentes ao tratamento, o que superestima a taxa de cura (de Vlas & Gryseels, 1992).

Os casos que permanecem positivos após o tratamento mantêm prevalências residuais, o que permite a inferência de que os vermes sobreviventes ao tratamento de alguma forma podem apresentar uma população resistente/tolerante ao medicamento. Este fato aponta para um possível processo de seleção de linhagens resistentes em função da pressão quimioterápica, principalmente quando ocorrem tratamentos sucessivos com o mesmo medicamento.

Apesar do aumento do conhecimento sobre a doença, os avanços no diagnóstico não são satisfatórios. Esta situação se reflete na eficácia dos programas de controle, tornando-se um dos mais importantes desafios de saúde pública, exigindo estratégias inovadoras e mais eficazes, tal como o emprego de metodologias diagnósticas alternativas, que permitam estabelecer índices de prevalência mais próximos da realidade (Enk *et al.*, 2007).

Recentemente, uma nova ferramenta utilizada para direcionar os esforços e estratégias de controle é o geoprocessamento, que permite o mapeamento das áreas indicando se a transmissão é focal ou esporádica. Uma vez que a esquistossomose é uma doença determinada no tempo e no espaço por fatores ambientais, é possível uma análise complexa de um grande número de informações e a visualização dos resultados desta análise em mapas gráficos através de

recursos computacionais, como Sistemas de Informações Geográficas (SIG) e Sensoriamento Remoto (SR) (Guimarães *et al.*, 2008).

A educação em saúde é uma medida de controle da doença que visa a conscientização da população em risco, de forma a levar o conhecimento das possíveis formas de infecção e o modo como evitá-las. Para prevenir é preciso conhecer. Além da prevenção da esquistossomose, a população deve ser conscientizada da forma de transmissão das outras helmintoses intestinais. Tanto a esquistossomose quanto as geohelmintoses podem ser diminuídas se água tratada e instalações sanitárias adequadas estiverem disponíveis.

### 1.5 Tratamento Específico e Controle de Cura

A introdução do praziquantel e a oxaminiquina como fármacos de escolha para o tratamento da esquistossomose teve como conseqüência a redução da morbidade da doença, porém sem ocorrer uma interrupção da transmissão.

O tratamento por si não é capaz de afetar os níveis locais de transmissão em longo prazo, devido principalmente a grande extensão das áreas endêmicas, a possibilidade do surgimento de resistência do parasito aos fármacos, as constantes reinfecções dos indivíduos e a carência de saneamento básico (King *et al.*, 2006).

O praziquantel foi desenvolvido na Alemanha durante os anos 70, fruto de uma colaboração entre as indústrias farmacêuticas Bayer AG (hoje Bayer Schering Pharma) e Merck Darmstadt (hoje Merck KGaA) (Moon & Smith, 2006).

A efetividade do praziquantel contra *S. mansoni* e outros helmintos é bem documentada, mas o modo de ação preciso da droga não está claramente definido. Alguns autores afirmam que a droga age dentro de 1 hora após a ingestão e seu mecanismo baseia-se na paralisação dos vermes por inibição dos canais de cálcio e por causar dano no tegumento, além de atuar no sistema excretor dos parasitos (Couto *et al.*, 2010, Oliveira *et al.*, 2006).

A sua boa atividade esquistossomicida, forma de administração (dose oral única) e a ausência de efeitos colaterais graves tornaram esta droga a de escolha para o tratamento da esquistossomose humana (Fallon *et al.*, 1996). Os efeitos colaterais mais comuns incluem náuseas, vômitos e dores abdominais. O custo atual de um comprimido contendo 600mg de praziquantel está em torno de US\$0.12 (Katz, 1999) e custo global estimado do tratamento varia de US\$ 1.5 a 6.5/pessoa (sem incluir custos operacionais) (Rabello, 1997).

Oxaminiquina (OXA) é efetiva somente contra *S. mansoni*, não sendo efetiva contra *S. haematobium*, *S. japonicum* ou outras espécies. Em contraste ao PZQ, o mecanismo de ação da OXA é relativamente bem conhecido. O principal mecanismo de ação desse fármaco relaciona-se com a sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucléicos. A esterificação do fármaco pela enzima sulfotransferase do parasito produz compostos eletrofílicos capazes de alquilar o DNA e outras moléculas do parasito (Cioli 1993). A perda da atividade enzimática pelo parasito é comum em linhagens resistentes (Pica-Mattoccia *et al.*, 2006).

Devido à oxaminiquina ter um complexo processo de fabricação, requerendo grandes tanques de fermentação para síntese biológica, esta apresenta um custo alto quando comparado ao praziquantel. Assim, o praziquantel tem sido praticamente a única droga utilizada no momento, e o seu uso único no tratamento em massa pode resultar em cepas resistentes (Araújo *et al.*, 2008).

A presença de ovos nas fezes constitui indicação fundamental ao tratamento. A positividade de métodos imunológicos não autoriza a instituição do tratamento devido a estas reações permanecerem positivas mesmo em pacientes curados, pois traduzem apenas a presença de anticorpos circulantes (Cunha, 1992).

O critério de cura parasitológica é a ausência de ovos nos três meses subseqüentes ao tratamento, o que indica que os vermes morreram. Já a presença de ovos viáveis nas fezes, indica postura dos ovos pelo parasito, podendo ser explicada pela ineficácia da droga ou pelas reinfecções constantes a que estão expostos os indivíduos das áreas endêmicas (Ferrari *et al.*, 2003). Como a atividade da droga pode causar uma marcada redução na carga parasitária e uma interrupção temporária da postura dos ovos, o método de Kato-Katz torna-se inadequado para detecção da infecção nestas situações devido a sua baixa sensibilidade (Coelho & Tavares, 1991).

## **1.6 Métodos Diagnósticos**

### **1.6.1 Métodos parasitológicos**

A demonstração direta do parasito – ovo ou miracídio – constitui método de diagnóstico de certeza. Porém, exames parasitológicos negativos não significam necessariamente que os indivíduos não estejam infectados (Chieffi & Kanamura, 1978). Este tem sido ainda hoje, um dilema encontrado no diagnóstico desta

doença, pois quando se avalia a prevalência por meio de técnicas parasitológicas, pode-se ter uma idéia falsa da realidade, principalmente em áreas com indivíduos com baixa intensidade de infecção, ocasionando uma subestimativa da prevalência real, com importantes conseqüências para o controle (De Vlas & Gryssels, 1992; Enk *et al.*, 2008).

No diagnóstico pela biópsia retal, fragmentos são retirados da mucosa retal para detecção de ovos. A quantificação de ovos por grama de tecido examinado recebe o nome de oograma. Esta técnica permite a avaliação da intensidade de infecção e costuma ser mais empregada quando repetidos exames de fezes resultam negativos ou na avaliação de eficiência terapêutica. Por se tratar de um método invasivo e bastante incômodo deve ser realizado em ambiente hospitalar com pessoal especializado (Ferrari *et al.*, 2003). Apesar de apresentar alta sensibilidade, é totalmente inviável para trabalhos epidemiológicos.

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

Os métodos parasitológicos de fezes são divididos em qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos detectam somente a presença dos ovos do parasito. O método de Lutz/Hoffmann, Pons e Janner, descrito por Lutz (1919) e aperfeiçoado por Hoffmann e cols. (1934), também conhecido como Método da Sedimentação Espontânea, ou HPJ, é um método qualitativo comumente aplicado na rotina laboratorial ou inquéritos coproparasitológicos, visto que possui baixa complexidade e custo na execução. O método foi originalmente utilizado por Hoffmann, Pons e Janer no diagnóstico da esquistossomose, mas atualmente tem sido amplamente utilizado no diagnóstico de outras helmintoses. O método de flutuação (Willis, 1921) e o método de centrifugação em éter sulfúrico (Blagg *et al.*, 1955) são também métodos qualitativos, mas pouco aplicados em estudos populacionais. O método de centrifugação baseia-se na sedimentação dos ovos através de um líquido de baixa densidade usando a força gerada pela centrifugação (Rabello, 1992).

Os métodos quantitativos além de detectar a presença do parasito, determinam o número de ovos ou miracídios presentes por grama de fezes. O método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) e os métodos de Eclosão de miracídios (Zicker *et al.*, 1977; Jurberg *et al.*, 2008), Gradiente salínico (Coelho *et al.*, 2009) e Helmintex (Teixeira *et al.*, 2007) são considerados quantitativos. Com exceção do

Kato-Katz, os demais estão em processo de validação. O método do TF-Test® (Gomes *et al.*, 2004) pelo protocolo do fabricante é somente qualitativo. Neste estudo o TF-Test® foi adaptado para ser quantitativo visando uma comparação com a técnica de Kato-Katz.

#### 1.6.1.1 Método Kato-Katz

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

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

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

O método de Kato-Katz apresenta outras limitações, dentre elas a impossibilidade de execução do método em amostras diarréicas, a não detecção de cistos de protozoários e larvas de helmintos, a baixa reprodutibilidade entre

amostras e entre lâminas diferentes de um mesmo indivíduo e entre leituras de examinadores diferentes (Kongs *et al.*, 2001). Aplicado em uma única amostra de fezes, este método é mais adequado para o controle de morbidade, mas menos adequado para o controle da transmissão (Engels *et al.*, 1996).

Estudo realizado por Enk *et al.*, 2008 demonstrou que a prevalência de 13,8% obtida com uma lâmina de Kato-Katz de uma única amostra, aumenta para 27,2%, com 10 lâminas em três amostras, e chega a 35,4%, pela combinação de exames denominada “Padrão Ouro”.

#### **1.6.1.2 Método de TF-Test®**

O método de TF-Test® (Three Fecal Test) é constituído por três tubos contendo uma solução preservadora (formalina 10%). Esta técnica baseia-se no processamento de três amostras fecais coletadas em dias diferentes, em uma única etapa, por meio de concentração do sedimento por centrifugação rápida. Possui um sistema de dupla filtração, sendo as malhas do primeiro filtro mais grossas que as do segundo, as quais reduzem consideravelmente partículas fecais, possibilitando melhor visualização de formas parasitárias à microscopia óptica (Gomes *et al.*, 2004). É abrangente para várias espécies parasitárias (helmintos e protozoários).

As técnicas de concentração de formas parasitárias por centrifugação foram descritas em muitos trabalhos (Knight *et al.*, 1976; Araújo, 2000; Mendes *et al.*, 2005). Na técnica de TF-Test®, utiliza-se também o acetato de etila para proporcionar a separação de componentes com diferentes densidades por meio de centrifugação do material fecal suspenso em solução neutra de formalina. O acetato de etila é o substituto encontrado por Young *et al.* (1979) para a solução de formalina-éter originalmente descrita por Ritchie (1948).

Existem diversas vantagens em se empregar um método que é capaz de detectar tanto espécies de helmintos quanto de protozoários, assim a expectativa era que o método do TF-Test quantitativo tivesse aplicabilidade em trabalhos de campo, fornecendo resultados comparáveis com outros métodos quantitativos.

### 1.6.2 Métodos imunológicos

Embora os métodos imunológicos só forneçam evidências indiretas da presença do parasito, estes podem ser ferramentas valiosas na triagem de indivíduos infectados em inquéritos epidemiológicos (Chieffi & Kanamura, 1978). Situações caracterizadas por indivíduos com baixa intensidade de infecção, com infecção crônica ou unissexuada limitam o diagnóstico por métodos parasitológicos de fezes. Nestes casos, os testes imunológicos têm se mostrado úteis para os estudos populacionais. As técnicas de imunodiagnóstico podem ser utilizadas tanto na detecção de antígenos circulantes de *Schistosoma* como na detecção de anticorpos produzidos contra o parasito. As preparações antigênicas são produzidas a partir dos diferentes estágios evolutivos do parasito, sendo os antígenos mais usados aqueles provenientes de vermes adultos (SWAP) e ovos (“Soluble eggs antigen” - SEA). As técnicas de imunofluorescência indireta e principalmente a ELISA são as mais aplicadas ao diagnóstico da doença (Oliveira *et al.*, 2003). O método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é o de escolha para o diagnóstico em massa por apresentar baixo custo, reprodutibilidade e facilidade de execução. A técnica realizada com antígenos brutos de *S. mansoni* superestima a prevalência da esquistossomose, já que não discrimina entre infecções ativas e passadas e apresenta reação cruzada com outros helmintos (Correa-Oliveira *et al.*, 1988).

O imunodiagnóstico da esquistossomose por detecção de antígenos circulantes específicos baseia-se na presença de antígenos derivados do parasito na circulação (De Jonge *et al.*, 1991). As abordagens para a detecção de antígenos circulantes geralmente envolvem captura do antígeno por anticorpos monoclonais. Dois dos antígenos circulantes mais comumente utilizados envolvem as glicoproteínas CAA (Antígeno Anódico Circulante) e CCA (Antígeno Catódico Circulante), derivadas do epitélio intestinal dos parasitos (Deelder *et al.*, 1980), sendo a presença destes antígenos indicativa de infecção ativa. As desvantagens da detecção de antígenos circulantes se deve ao fato que a sensibilidade desse tipo de ensaio é baixa nos casos em que a prevalência e intensidade de infecção são baixas, podendo até mesmo ser inferior aos testes parasitológicos (De Jonge *et al.*, 1991), além de apresentarem alto custo e dependência da produção de anticorpos monoclonais (Rabello, 1997).

### 1.6.3 Métodos moleculares

A PCR (*Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase*) é uma técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detectar uma pequena quantidade de DNA em uma amostra. A PCR baseia-se em ciclos que se repetem na forma de três etapas: desnaturação, anelamento e amplificação. Estas etapas ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo, na presença de reagentes termo-estáveis, e seqüências específicas de DNA a serem amplificadas. Os reagentes usados são: (1) dois pequenos iniciadores (primers), sintetizados para serem complementares às seqüências conhecidas do DNA alvo, (2) grande quantidade dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e (3) a enzima termoestável Taq DNA-polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, bem como seu tampão específico (Eisenstein, 1990).

A reação de PCR para o diagnóstico da esquistossomose é baseada na amplificação de uma seqüência de DNA altamente repetitiva encontrada no genoma de *S. mansoni* (Hamburguer et al., 1991). Esta técnica foi primeiramente descrita por Pontes et al. (2002) para detecção de DNA do parasito em amostra de fezes humanas e foi avaliada em áreas endêmicas, sendo capaz de detectar um fentograma de DNA de *S. mansoni* (Pontes et al., 2003). A especificidade deste teste foi demonstrada pela ausência da amplificação de DNA de outros helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Taenia solium* e *Trichiuris trichiura*) que comumente infectam pessoas das áreas endêmicas. Esta técnica demanda infra-estrutura laboratorial e empenho operacional mais complexo, embora seja mais sensível que as técnicas de Kato-Katz e detecção de antígenos. É indicada para o diagnóstico de *Schistosoma* sp. em situações especiais onde alta sensibilidade e especificidade são requeridas e infra-estrutura é disponível (Rabello et al., 2002). Alguns estudos têm demonstrado também o uso da PCR em amostras de urina (Sandoval et al., 2006).

A técnica da PCR-ELISA em amostras de fezes humanas está em fase de validação, é uma abordagem diagnóstica nova que combina a especificidade de um método molecular a um método imunológico (Gomes et al., 2010).



### 1.6.3.1 PCR-ELISA

A PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) consiste em um processo alternativo de visualização do produto amplificado que permite uma análise semi-quantitativa para o diagnóstico da esquistossomose. Esta técnica combina um método imunológico para quantificar o produto da PCR diretamente após a ligação do DNA marcado com biotina em uma microplaca sensibilizada com estreptoavidina. A vantagem da PCR-ELISA quando comparada com PCR convencional é que a primeira faz uso de um equipamento padronizado amplamente usado para o processamento de ELISAs, e os reagentes usados são fáceis de obter comercialmente (Gomes *et al.*, 2010). Além disso, a PCR convencional requer várias etapas após a amplificação do DNA, incluindo eletroforese e hibridização. A eletroforese é limitada pelo número de amostras que podem ser analisadas.

Dentre as principais vantagens da PCR-ELISA, está o fato de esta ser uma técnica semi-quantitativa com potencial para estimar a carga parasitária, permite um processamento de maior número de amostras em relação à eletroforese e uma interpretação objetiva dos resultados. É indicada em situações epidemiológicas de baixa carga parasitária, onde a técnica de Kato-Katz apresenta sensibilidade limitada. Outra aplicação da técnica será na avaliação de vacinas, de novas drogas terapêuticas e de focos epidemiológicos restritos e situações individuais de controle de cura.

## 2 Justificativa

O presente estudo se justifica pela urgente necessidade do aprimoramento da metodologia estabelecida para realização do diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa prevalência da doença.

A necessidade de testes diagnósticos precisos e acurados aumenta fortemente quando os métodos já existentes se mostram pouco sensíveis em áreas de baixa prevalência. Embora a técnica de Kato-Katz seja o método de escolha para áreas de média e alta endemicidade, a mesma falha em detectar muitos casos em situações caracterizadas por baixa transmissão e baixa intensidade de infecção individual (Enk *et al.*, 2008). Esta técnica é a de escolha pelas vantagens que possui, dentre elas o baixo custo e a possibilidade de ser executada em laboratórios com infra-estrutura básica.

A sensibilidade dos métodos diagnósticos diretos está relacionada com a carga parasitária, que na maioria dos casos está correlacionada com a prevalência da doença. Assim, quanto menor a prevalência, menor será a capacidade dos métodos diagnósticos em detectar os casos positivos. Conseqüentemente, maior será a complexidade e custo dos métodos a serem adotados, envolvendo técnicas sorológicas e de biologia molecular (Bergquist *et al.*, 2009).

Diante do exposto, fica claro que pesquisas visando o aprimoramento da metodologia em uso, em fase de validação ou em desenvolvimento, se tornam vitais frente ao problema de sensibilidade limitada das técnicas devido a baixas cargas parasitárias. A procura de métodos mais sensíveis, mais específicos e de baixo custo deve ser uma meta fundamental das instituições públicas que tem como missão apresentar ferramentas para auxiliar no controle e erradicação de doenças endêmicas.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é a avaliação comparativa do desempenho de métodos diagnósticos (Kato-Katz, TF-Test® e PCR-ELISA) em uma área considerada de baixa endemicidade para esquistossomose mansoni.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o método parasitológico Kato-Katz para o diagnóstico de *S. mansoni* (e outros helmintos) na população, em relação a número de lâminas e amostras utilizadas em comparação com os outros métodos empregados neste estudo;
- Avaliar o método parasitológico TF-Test® para o diagnóstico do *S. mansoni* (e outros helmintos) na comunidade em comparação ao método de Kato-Katz;
- Avaliar o método diagnóstico molecular PCR-ELISA nas fezes dos participantes do estudo em comparação ao método de Kato-Katz;
- Avaliar as diferenças de sensibilidade dos métodos aplicados;
- Estimar a prevalência por faixa etária, gênero e localidade;
- Avaliar a distribuição geográfica da esquistossomose na área estudada.

#### **4 Considerações éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR (CEPSH/ CPqRR: Nº 03/2008) e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer Nº 784/2008, CONEP 14886). O projeto foi apresentado e explicado para os moradores da localidade. Todos foram esclarecidos quanto ao objetivo do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido como exigido pelo CONEP (Anexos).

## 5 Material e Métodos

### 5.1 Área de estudo

O estudo foi realizado na localidade de Pedra Preta, região endêmica para esquistossomose na zona rural do município de Montes Claros, região Norte de Minas Gerais, situada a aproximadamente 500 km de Belo Horizonte.

Pedra Preta é composta por duas localidades rurais: Buriti Seco e Morro Grande (juntas totalizam 230 habitantes), e pela área central (também 230 habitantes). A região é banhada pelos córregos Buriti Seco, Riachão, Córrego da Passagem e Córrego Jaboticabas, que são utilizados para algumas atividades como pesca, lazer e passagem. A principal atividade exercida pela população de Pedra Preta está ligada à plantação de milho e feijão.

A área foi escolhida pelo perfil da população, que não havia sido tratada para esquistossomose, pelo baixo índice de migração (população residente fixa) e por uma prevalência de 12% da endemia em 2005 segundo registros do Centro de Controle de Endemias/Montes Claros.



Figura 7. Área Rural de Pedra Preta/ Montes Claros- MG. Fonte: Arquivos da autora



Figura 8. Área urbana de Pedra Preta/ Montes Claros- MG. Fonte: Arquivos da autora.

O estudo foi realizado nas comunidades Morro Grande (em vermelho) e Buriti Seco (em verde) (Figura 9).

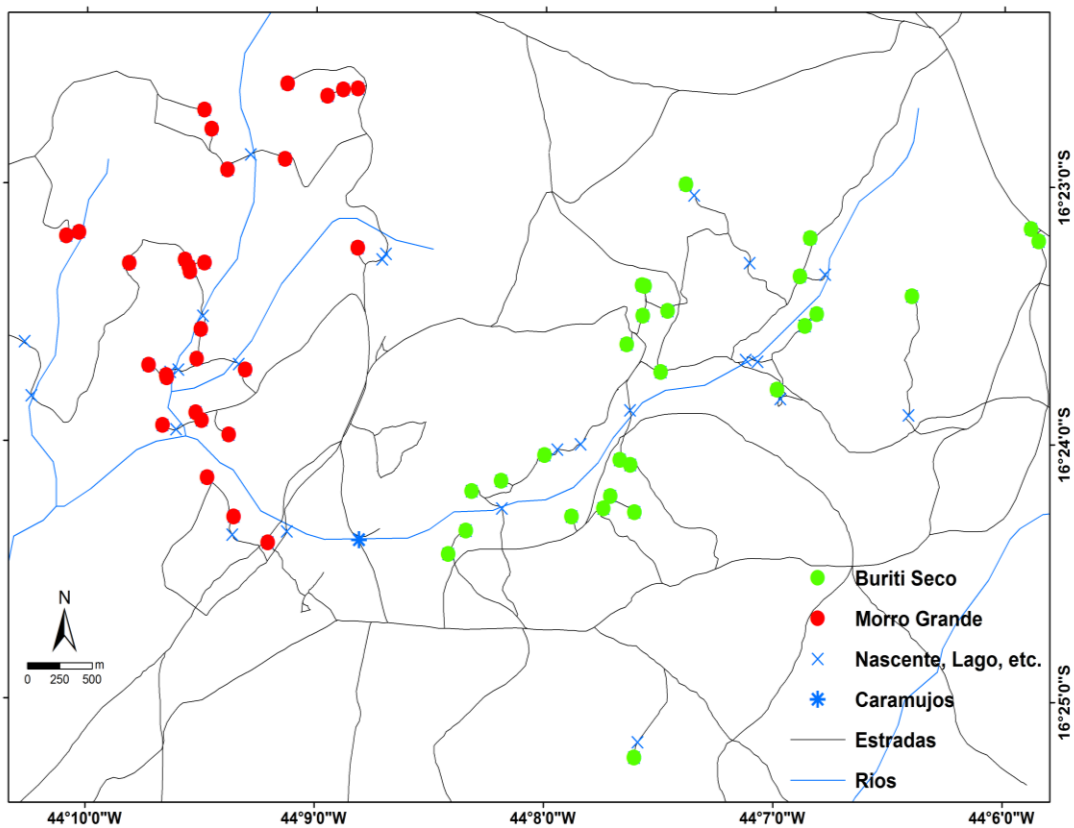


Figura 9. Mapa da área de estudo / Distribuição das residências por localidade.  
Fonte: Geoprocessamento realizado pelo Dr. Ricardo Guimarães



## 5.2 População de Estudo

Todas as pessoas que realizaram o exame de fezes foram incluídas neste estudo. Um total de 201 pessoas realizou o exame parasitológico de fezes. A faixa etária da população inclui indivíduos de 01 a 94 anos, sendo 93 mulheres e 108 homens.

Este estudo é de base populacional e não amostral.



Figura 10. Entrega do pote coletor para os participantes. Fonte: Arquivos da autora

## 5.3 Coleta de dados

A coleta das amostras de fezes para o primeiro inquérito epidemiológico ocorreu no mês de agosto de 2009.

### 5.3.1 Exame parasitológico de fezes

O exame parasitológico de fezes foi realizado por duas técnicas, o método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) e o método de TF-test®.

#### 5.3.1.1 Método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972)

Este método foi realizado utilizando o Helm-Test®. A tela pertencente ao kit é colocada sobre as fezes, pressionando-as com o auxílio de uma espátula. As fezes assim filtradas são transferidas para o orifício do cartão, que deve estar sobre uma lâmina. Após preencher completamente o orifício, o cartão é retirado deixando

as fezes sobre a lâmina de vidro. As fezes são cobertas com lamínula de celofane semipermeável, previamente embebida em solução de verde-malaquita, e a lâmina é invertida e pressionada contra o papel para a formação de uma camada delgada entre lâmina e lamínula. As lâminas secam completamente após 2 horas, podendo ser examinadas até 3 meses depois, se devidamente acondicionadas, sem prejuízo dos resultados.

Para execução do método de Kato-Katz, foram coletadas quatro amostras de fezes de cada indivíduo em frascos de plástico identificados com o nome, número do participante e da casa, durante quatro dias consecutivos (Figura 11). Foram preparadas 12 lâminas da primeira amostra, 2 lâminas da segunda, terceira e quarta amostra, perfazendo-se um total de 18 lâminas para cada indivíduo. Estas lâminas foram confeccionadas na área de estudo pelos técnicos do Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros/MG (Figura 12). A leitura das lâminas foi terceirizada para técnicas do Laboratório de Imunopatologia da UNIVALE/Governador Valadares/MG.



Figura 11. Recebimento das amostras de fezes. Fonte: Arquivos da autora





Figura 12. Confeção das lâminas de Kato-Katz. Fonte: Arquivo da autora.

#### **5.3.1.2 Método de TF-Test®**

As fezes foram filtradas em tela de nylon apropriada e a quantificação do material foi realizada utilizando placa quantificadora de 500 mg. As três amostras foram adicionadas aos tubos contendo a solução preservadora (formalina a 10%), totalizando 1500 mg em três tubos. As amostras conservadas foram processadas no Laboratório de Esquistossomose/CPqRR. A cada tubo foram adicionados 3 mL de acetato de etila e 1 gota de detergente neutro. Os três tubos foram conectados a um aparato, onde a mistura passa por duplo filtro, e é concentrada por uma centrifugação rápida (1 minuto a 1500 rpm). O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido analisado.

O método de TF-Test® foi realizado também utilizando 500 mg de material fecal em uma amostra aleatória de 54 pessoas das 201 incluídas no estudo, para comparação direta com 12 lâminas do método de Kato-Katz.

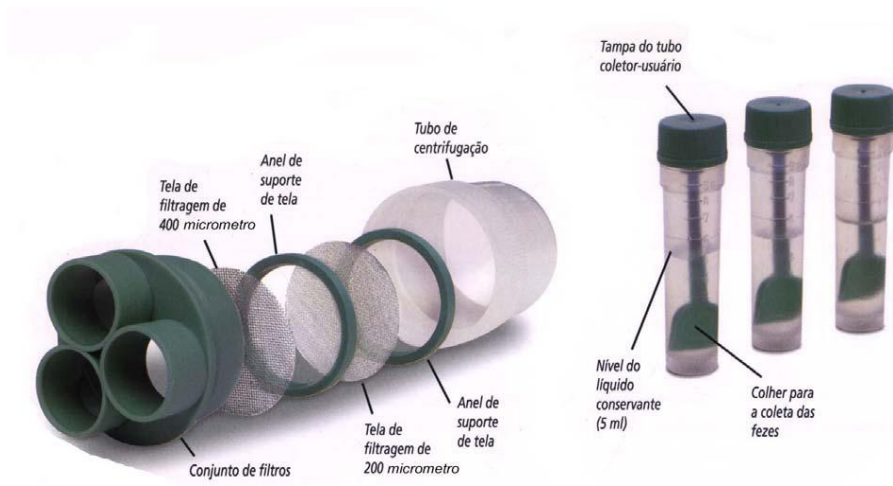


Figura 13. Aparato do Kit TF-Test®. Fonte: Site do Fabricante [www.immunoassay.com.br](http://www.immunoassay.com.br)



Figura 14. Análise do sedimento das fezes em microscópio óptico. Fonte: Arquivos da autora.



Figura 15. Centrífuga Especial para o Kit TF-Test®. Fonte: Arquivos da autora.

### 5.3.2 Método Molecular

#### 5.3.2.1 Método PCR-ELISA (Gomes *et al.*, 2010)

Esta etapa foi realizada integralmente com a colaboração do Laboratório de Pesquisas Clínicas – CPqRR. A quantidade de 500 mg da primeira amostra fecal foi mantida congelada a (-20°C) até a realização do método diagnóstico molecular.

O DNA das amostras fecais de 500 mg foi extraído usando o Kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante e seguindo os protocolos “DNA Isolation from Large Amounts of Stool” e “Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection”.

Na reação de PCR foram usados iniciadores que amplificam a sequência repetitiva de 121 bp de *S. mansoni* (Hamburguer *et al.*, 1991). O primer senso é marcado com biotina (5'-GATCTGAATCCGACCAACCG-3') e primer anti-senso não marcado (5'ATATTAACGCCACGCTCTC-3'). Para a amplificação, o pré-mix foi preparado pela adição de 2 µl de tampão da enzima GeneAmp 10X PCR Gold (150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl), 2.0 U de Amplitaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,1 mg/ml de BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5 mM de cada primer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 200mM de dNTPs (Promega, Madison, WI, USA). Foram utilizados 18 µL do pré-mix e a este volume foi adicionado 2µL da amostra (diluída 5 vezes) em cada tubo, que foram colocados no termociclador e a amplificação foi conduzida nos seguintes ciclos de programas: 15 ciclos a 95°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 30s, 12 ciclos a 80°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 30 s, 7 ciclos a 80°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 30s e uma etapa final de alongação a 72°C por 7 min (Figura 16).

Os produtos da amplificação foram revelados em placa de ELISA sensibilizada com estreptoavidina utilizando o Kit comercial “PCR Plate Detection” (Sigma, St. Louis, MO, USA), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras (5 µL) aplicadas na placa foram diluídas (1:20) em tampão de diluição (95 µL), incubadas em câmara úmida por 30 min a 37°C. Após esta etapa, foram adicionados 100 µL de solução de desnaturação, as placas foram incubadas por 10 min em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes em PBS Tween 20, e foram adicionados 200 µL de tampão de hibridização que contém a sonda marcada com fluoresceína (5'-TGGTTTCGGAGATACAACGA-3') e incubadas

por 45 min em câmara úmida. Após esta etapa as placas foram lavadas 5 vezes em PBS Tween 20, e foram adicionados 150  $\mu$ L da solução contendo o conjugado anti-fluoresceína marcado com peroxidase, incubadas por 45 min em câmara úmida. As placas foram lavadas 5 vezes em PBS Tween 20, e foram adicionados 100  $\mu$ L de substrato cromogênico TMB, as placas foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente sob abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50  $\mu$ L de solução de parada e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Figura 17).

Cada reação da PCR-ELISA foi realizada com controles positivos (DNA extraído de ovos de *S. mansoni*) e controles negativos (água e controle negativo de PCR). Todos os experimentos foram feitos em duplicata, e os dados representam a média dos valores (Figura 18). O cut-off foi determinado pela média das absorbâncias mais três desvios-padrão da leitura da reação de amostras de DNA extraídas de fezes de 20 indivíduos pertencentes ao Laboratório de Pesquisas Clínicas do CPqRR. O valor do cut-off encontrado foi de 0,116. Indivíduos com média das absorbâncias acima do cut-off foram considerados positivos.

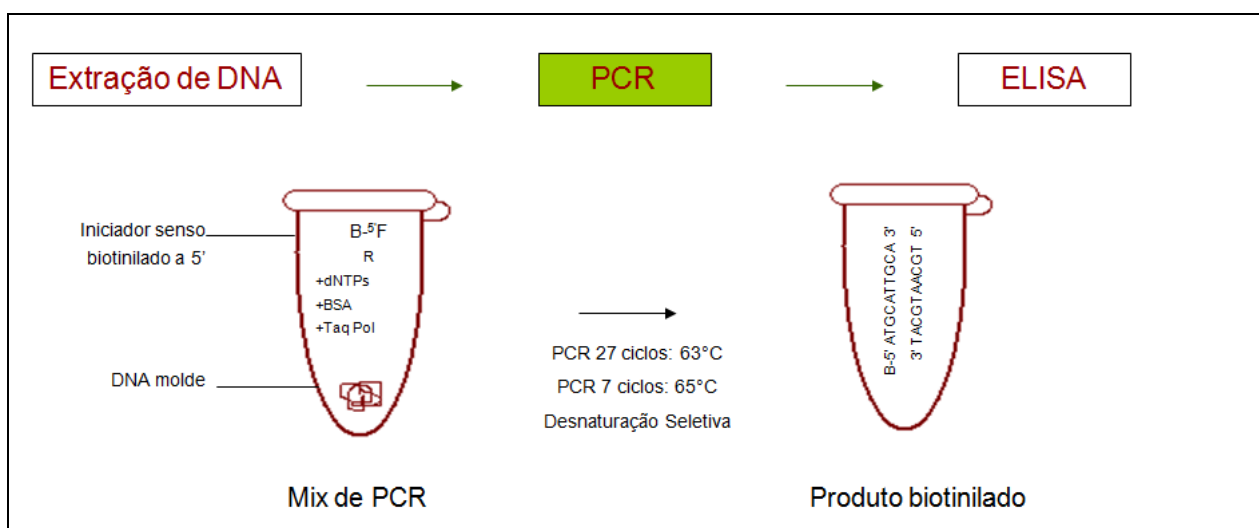


Figura 16. Etapas da Amplificação / PCR-ELISA. Fonte: Cedido gentilmente pela Dra. Luciana Inácia Gomes.

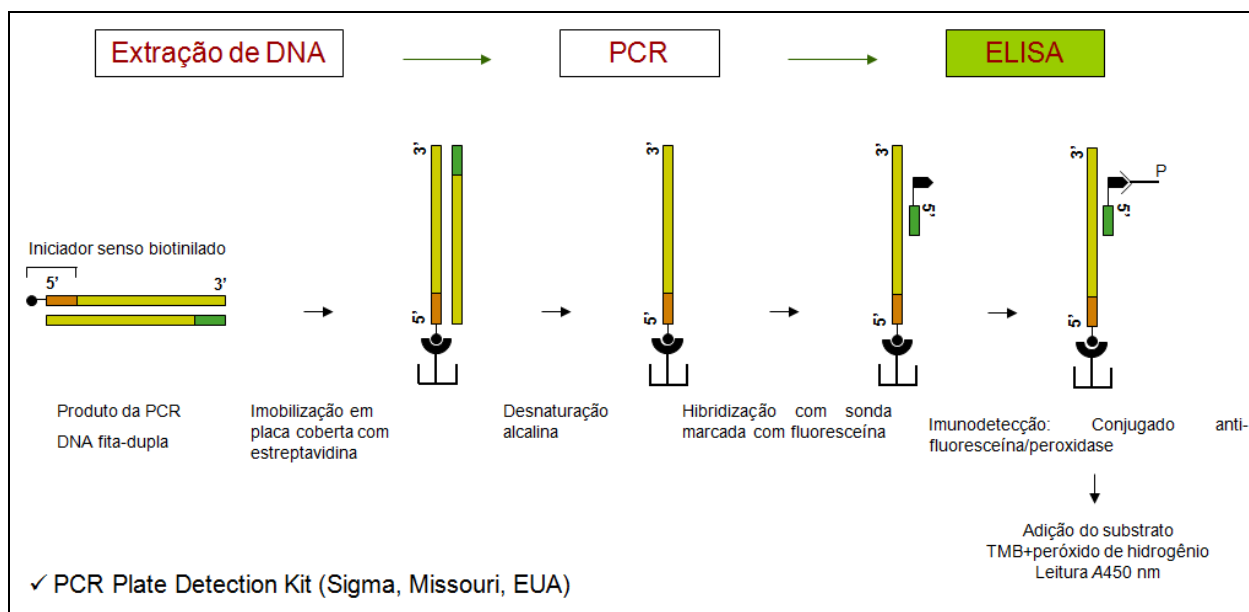


Figura 17. Etapas da Revelação/PCR-ELISA. Fonte: Cedido gentilmente pela Dra. Luciana Inácia Gomes

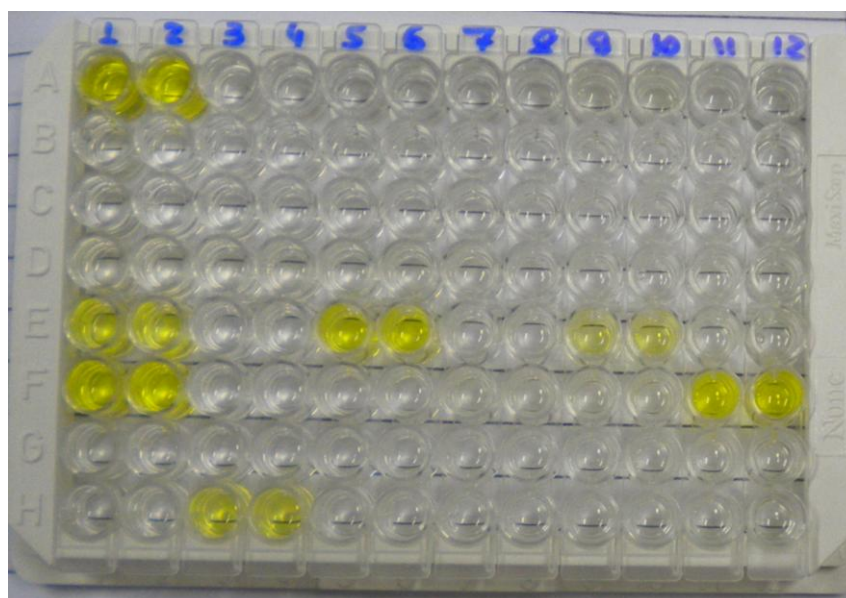


Figura 18. Revelação do PCR em placa de ELISA sensibilizada com estreptoavidina. Fonte: Arquivos da autora

### 5.3.3 Tratamento e Controle de Cura

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

O controle de cura foi realizado pela aplicação dos métodos de diagnóstico parasitológicos 30, 90 e 180 dias após o tratamento. Esta reavaliação ocorreu nos meses de abril (30 dias após o tratamento), junho (90 dias após tratamento) e setembro (180 dias após tratamento) de 2010. Os positivos para esquistossomose e outros helmintos em cada etapa da reavaliação foram tratados como descrito acima.

### 5.3.4 Intensidade de infecção

A intensidade de infecção foi calculada em ovos por grama de fezes (opg). A carga parasitária individual foi determinada pela média aritmética do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes. A carga parasitária da população foi determinada pela média geométrica do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

Para o método de Kato-Katz, a intensidade de infecção foi obtida pela soma do número de ovos encontrados nas 18 lâminas. Este valor foi multiplicado por 24 e dividido por 18, isto porque cada lâmina de KK tem capacidade para 41,7 mg ( $41,7 \times 24 = 1000$  mg ou 1 grama).

Para o TF-Test®, o opg foi calculado multiplicando por 2 o número de ovos encontrados no sedimento total e dividindo por 3, isto porque o método utiliza 1,5 g de fezes ( $1,5 \times 2/3 = 1$  grama de material fecal).

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

## 5.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Programa SPSS Versão15.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para comparações entre proporções. O nível de significância foi determinado com  $p < 0,05$ .

#### 5.4.1 Prevalência e Taxa de Positividade

A prevalência da esquistossomose foi calculada pelo número de positivos para *S. mansoni* obtido pelo “Padrão Ouro” dividido pelo número total de participantes do estudo.

A taxa de positividade foi obtida pelo número de positivos por técnica ou por lâminas de Kato-Katz e combinações de número de lâminas e de amostras dividido pelo total de participantes do estudo.

#### 5.4.2 “Padrão Ouro”

O “Padrão Ouro” foi determinado pelo somatório dos resultados positivos obtidos pelos dois métodos parasitológicos. Este valor foi utilizado como referência para os demais cálculos na avaliação dos métodos diagnósticos do estudo.

#### 5.4.3 Parâmetros estatísticos utilizados na validação de métodos diagnósticos

**Sensibilidade** é a capacidade de uma determinada técnica em detectar o maior número de indivíduos verdadeiramente doentes ( $a/a + b$ ) (Figura 19).

**Especificidade** é a capacidade de um teste ser sempre negativo na ausência de doença ( $d/c + d$ ).

**Valor preditivo positivo** é a proporção dos resultados com teste positivo, que identificam verdadeiramente a presença da doença em todos os testes positivos ( $a/a+c$ ).

**Valor preditivo negativo** é a proporção dos resultados com teste negativo, que identificam verdadeiramente a ausência da doença em todos os testes negativos ( $b/b+d$ ).

**Eficácia** é a capacidade do teste de classificar corretamente o maior número de indivíduos avaliados entre verdadeiramente doentes e saudáveis ( $a+d/a + b + c + d$ ).

A especificidade dos testes parasitológicos é muito alta considerando que não há resultados falsos por erros grosseiros (contaminação, ou mistura de fezes, por exemplo). Quando o ovo do parasito é visualizado e identificado corretamente não existe chance dos resultados serem falsos positivos.

		Padrão Ouro	
		Positivo	Negativo
Teste	Positivo	a	c
	Negativo	b	d

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

Figura 19. Categorias de classificação da doença por métodos diagnósticos.  
Fonte: Adaptado de Rabello, 1997

#### 5.4.4 Concordância Diagnóstica

O grau de concordância entre métodos de diagnóstico foi determinado pelo coeficiente kappa. Segundo Landis e Koch (1977) a concordância entre métodos será *ruim* quando o índice kappa for menor que 0,20, *fraca* quando entre 0,21 - 0,40, *moderada* quando entre 0,41 – 0,60, *boa* quando entre 0,61 – 0,80 e *excelente* quando maior que 0,81.

#### 5.5 Geoprocessamento

Os dados georeferenciados foram analisados na plataforma ArcGIS tendo sido produzidos mapas que permitem visualizar a distribuição dos dados e identificar os padrões espaciais estatisticamente significantes. Foram identificadas as aglomerações e associações. Foi feito o mapa de densidade de Kernel (Diggle, 2003) para examinar a distribuição espacial dos indivíduos.

A estimativa Kernel é uma técnica estatística, de interpolação, não paramétrica, que produz uma superfície contínua (aglomerado) de densidade calculada em todas as localizações, para a identificação visual de “áreas quentes” (hotspot), sem alterar as suas características locais (Bailey & Gatrell, 1995).



## 6 Resultados

### 6.1 Prevalência da esquistossomose

De acordo com o “Padrão Ouro”, o somatório de 18 lâminas de 4 amostras examinado pelo método Kato-Katz e de 500mg de 3 amostras pela técnica de TF-Test, foi detectado uma prevalência de 35,8%, sendo 72 positivos dos 201 participantes. Este valor é a referência para todas as comparações.

### 6.2 Método de Kato-Katz

#### 6.2.1 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* com uma lâmina

Uma lâmina de Kato-Katz de uma amostra (L1A1) é o procedimento de rotina adotado pelos programas de controle da esquistossomose no Brasil. A taxa de positividade obtida com uma lâmina de Kato-Katz foi de 8,0%, ou seja, 16 positivos dos 201 participantes. Esta taxa quando comparada com a prevalência de 35,8% (72/201) obtida pelo “Padrão Ouro” demonstra uma significativa subestimativa da prevalência da doença em 4,5 vezes (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de positividade de uma lâmina de KK em relação ao “Padrão Ouro”

L1 A1	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	16	0
Negativo	56	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

#### 6.2.2 Efeito do aumento do número de lâminas de uma única amostra na taxa de positividade e sensibilidade da técnica na detecção da infecção com *S. mansoni*

Os resultados obtidos pelo método de Kato-Katz em uma lâmina, em três lâminas, em seis lâminas e em 12 lâminas da primeira amostra foram avaliados.

Em uma lâmina de Kato-Katz da primeira amostra, 16 (8,0%) indivíduos foram positivos, 19 (9,5%) em três, 25 (12,4%) em seis e 29 (14,4%) em 12 lâminas da mesma amostra (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de positividade acumulada e sensibilidade decorrente do aumento de número das lâminas analisadas da primeira amostra

	L1A1	L3A1	L6A1	L12A1
<b>Taxa de Positividade</b>	8,0%	9,5%	12,4%	14,4%
<b>Sensibilidade</b>	22,2%	26,4%	34,7%	40,2%

### 6.2.3 Variação na detecção de ovos de *Schistosoma mansoni* entre lâminas de uma mesma amostra

A taxa de positividade e a sensibilidade obtida em cada lâmina da primeira amostra foi avaliada, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as lâminas, o que foi confirmado pela comparação entre as proporções de 6,0% e 8,5%, que representam a menor e a maior taxa de positividade ( $p=0,335$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de positividade para *Schistosoma mansoni* e sensibilidade encontradas para cada uma das 12 lâminas da primeira amostra examinada

	L1A1	L2A1	L3A1	L4A1	L5A1	L6A1	L7A1	L8A1	L9A1	L10A1	L11A1	L12A1
<b>Taxa de Positividade</b>	8,0%	6,0%	7,5%	7,5%	8,5%	8,5%	7,0%	6,0%	7,0%	7,5%	6,5%	7,0%
<b>Sensibilidade</b>	22,2%	16,7%	20,8%	20,8%	23,6%	23,6%	19,4%	16,7%	19,4%	20,8%	18,1%	19,4%

#### 6.2.4 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* examinando 12 lâminas de uma única amostra

A fim de realizar uma comparação quantitativa entre os métodos parasitológicos, foram utilizadas 12 lâminas da primeira amostra de fezes, isto porque cada lâmina de Kato-Katz tem capacidade para uma quantidade de 41,7 mg (12 lâminas x 41,7 = 500mg de material fecal). A taxa de positividade obtida foi de 14,4% (29/201) e a sensibilidade de 40,3%. O valor preditivo negativo foi de 75,0% (Tabela 4).

Tabela 4. Taxa de positividade de doze lâminas de Kato-Katz em relação ao “Padrão Ouro”

12 lâminas	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	29	0
Negativo	43	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

#### 6.2.5 Avaliação da taxa da positividade para infecção com *S. mansoni* examinando uma lâmina da 1ª, 2ª, 3ª amostra (3 lâminas de 3 amostras)

A taxa de positividade encontrada por 3 lâminas de 3 amostras (uma lâmina de cada) foi de 18,4%, detectando 37 positivos. A sensibilidade obtida com este número de lâminas foi de 51,4%. E um valor preditivo negativo de 78,7% (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de positividade de três lâminas de Kato-Katz de 3 amostras em relação ao “Padrão Ouro”

1L x 3A	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	37	0
Negativo	35	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

### 6.2.6 Avaliação da taxa da positividade para infecção com *S. mansoni* examinando 2 lâminas da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> amostra (6 lâminas de 3 amostras)

Seis lâminas de três amostras é um padrão internacionalmente reconhecido para o método de Kato-Katz. A taxa de positividade encontrada por 6 lâminas de 3 amostras foi de 21,4% detectando 43 positivos. A sensibilidade obtida com este número de lâminas foi de 59,7%. E um valor preditivo negativo de 81,6% (Tabela 6).

Tabela 6. Taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* examinando seis lâminas de Kato-Katz de 3 amostras em relação ao “Padrão Ouro”

2L x 3A	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	43	0
Negativo	29	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

### 6.2.7 Avaliação da taxa da positividade para infecção com *S. mansoni* examinando 2 lâminas da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> amostra (8 lâminas de 4 amostras)

A taxa de positividade encontrada por 8 lâminas foi de 24,4% (49/201) e a sensibilidade obtida com este número de lâminas foi de 68,1% (Tabela 7). O valor preditivo negativo foi de 84,9%.

Tabela 7. Taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* examinando oito lâminas de Kato-Katz de 4 amostras em relação ao “Padrão Ouro”

2L x 4A	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	49	0
Negativo	23	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

### 6.2.8 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* com 12 lâminas da primeira amostra, 2 lâminas da 2ª, 3ª e 4ª amostra (18 lâminas de 4 amostras)

Analisando um total de 18 lâminas de 4 amostras, 58 participantes foram positivos para *S. mansoni* correspondendo uma taxa de positividade de 28,9%. Esta combinação de número de lâminas e amostras apresentou uma sensibilidade de 80,6% (Tabela 8). E um valor preditivo negativo de 90,2%.

Tabela 8. Taxa de positividade de 18 lâminas de Kato-Katz de 4 amostras em relação ao “Padrão Ouro”

18 LÂMINAS	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	58	0
Negativo	14	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

### 6.2.9 Avaliação do efeito do aumento do número de amostras na taxa da positividade e sensibilidade da técnica de Kato-Katz na detecção da infecção por *S. mansoni*

O efeito do aumento do número de amostras é observado pelo aumento da taxa de positividade a cada amostra adicional analisada (Tabela 9).

Como já mencionado, 12 lâminas da primeira amostra apresentou uma taxa de positividade de 14,4% e uma sensibilidade de 40,3%. A combinação da primeira amostra com a segunda (A1+A2) apresentou uma taxa de positividade de 15,4% (31/201) e uma sensibilidade de 43,1%. A combinação da primeira amostra, segunda amostra e terceira amostra (A1+A2+A3) detectou 53 positivos, uma taxa de positividade de 26,4% e uma sensibilidade de 73,6%. A combinação das 4 amostras (A1+A2+A3+A4) detectou 58 (28,9%) positivos para *S. mansoni* em um total de 18 lâminas analisadas por participante, e uma sensibilidade de 80,6%.

Tabela 9. Efeito do aumento no número de lâminas examinadas pelo método de Kato-Katz na sensibilidade da técnica e taxa de positividade para esquistossomose

Lâminas	Amostras	Negativos	Positivos	Prev (%)	Sens (%)	VPN
1	1	185	16	8,0	22,2	69,7
12	1 (A1)	172	29	14,4	40,3	75,0
14	2 (A1+A2)	170	31	15,4	43,1	75,9
16	3 (A1+A2+A3)	148	53	26,4	73,6	87,2
18	4 (A1+A2+A3+A4)	143	58	28,9	80,6	90,2
PO*	4	129	72	35,8	100,0	100,0

\*PO = Padrão Ouro

### 6.3 Técnica de TF-TEST®

#### 6.3.1 Avaliação da detecção da infecção com *S. mansoni* em 1500mg de 3 amostras de fezes

O TF-Test® realizado em três amostras de fezes de 500 mg cada, detectou 32 participantes positivos para *S. mansoni*, indicando uma taxa de positividade de 15,9%. A sensibilidade obtida foi de 44,4%, quando comparado com o “Padrão Ouro”, mostrando um valor preditivo negativo de 76,3% (Tabela 10).

Tabela 10. Taxa de positividade do TF-Test® em relação ao “Padrão Ouro”

TF-TEST	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	32	0
Negativo	40	129
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>129</b>

## 6.4 Avaliação comparativa entre os métodos TF-Test® e Kato-Katz

### 6.4.1 Comparação direta utilizando 500mg de fezes da mesma amostra utilizando os métodos de Kato-Katz e TF-Test®

A comparação direta de 500mg de material fecal de 54 pessoas da mesma amostra entre TF-Test® e doze lâminas de Kato-Katz revelou quatro ou 7,4% e oito ou 14,8% positivos para *S. mansoni*, respectivamente. As técnicas em combinação identificaram 10 positivos (18,5% de positividade), dos quais dois foram concordantes (Tabela 11). A sensibilidade do TF-Test foi de 40,0% e a sensibilidade do método de Kato-Katz foi de 80%.

Tabela 11. Comparação direta (500mg) entre Kato-Katz e TF Test®

Técnica	Sensibilidade	Positividade para <i>S. mansoni</i>
Kato Katz (12 lâminas ~ 500 mg)	80,0% (8/10)	14,8% (8/54)
TF-Test (500mg)	40,0% (4/10)	7,4 % (4/54)

### 6.4.2 Comparação entre o método de TF-TEST® utilizando 1500 mg provenientes de 3 amostras e a técnica de Kato-Katz examinando 6 lâminas de 3 amostras

Os resultados obtidos pelo exame de seis lâminas de Kato-Katz de três amostras diferentes (duas lâminas de cada amostra) e o obtido pelo TF-Test® são mostrados na Tabela 12.

A proporção de positivos pelo método de Kato-Katz foi de 21,4% (43/201) enquanto que o TF-Test® identificou 15,9% (32/201) positivos, sendo que esta diferença não se mostrou significativa ao teste Qui-quadrado ( $p=0,159$ ) (Tabela 12).

O TF-Test® apresentou uma sensibilidade de 44,4% (32/72). A sensibilidade de 6 lâminas de Kato-Katz foi de 59,7% (43/72), mesmo este utilizando 250 mg de fezes (41,7mg x 6 = 250 mg), ou seja, 6 vezes menos material fecal que o TF-Test®. A diferença entre estas proporções não foi estatisticamente significativa ( $p=0,067$ ).

Tabela 12. Comparação da positividade obtida pelos métodos TF-Test® - 1500mg de 3 amostras - e Kato-Katz - 6 lâminas de 3 amostras (duas lâminas de cada)

<b>Resultado</b>	<b>KK 6L3A</b>		<b>TF-TEST</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Negativo	158	78,6	169	84,1
Positivo	43	21,4	32	15,9
Total	201	100	201	100

#### 6.4.3 Comparação entre o método de TF-TEST® utilizando 1500 mg de 3 amostras e a técnica de Kato-Katz examinando 3 lâminas de 3 amostras

A proporção de positivos em três lâminas de 3 amostras (uma lâmina de cada) pelo método de Kato-Katz foi de 18,4% (37/201), enquanto que o TF-Test identificou 15,9% (32/201) de positivos, esta diferença não se mostrou significativa ao teste Qui-quadrado ( $p=0,508$ ) (Tabela 13). A sensibilidade obtida pelo método de Kato-Katz foi de 51,4% (37/72) e a obtida pelo TF-Test, 44,4% (32/72). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,404$ ).

Tabela 13. Comparação da positividade obtida pelos métodos TF-Test® - 1500mg de 3 amostras - e Kato-Katz - 3 lâminas de 3 amostras (1 lâmina de cada)

<b>Resultado</b>	<b>KK 3L3A</b>		<b>TF-TEST</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Negativo	164	81,6	169	84,1
Positivo	37	18,4	32	15,9
Total	201	100	201	100



#### 6.4.4 Comparação entre o método de TF-TEST® utilizando 1500 mg de 3 amostras e a técnica de Kato-Katz examinando 12 lâminas da mesma amostra

A comparação dos resultados obtidos pela análise de doze lâminas de Kato-Katz de uma única amostra e pelo TF-Test® utilizando 1500 mg de 3 amostras (500 mg de cada) é mostrada na Tabela 14.

A proporção de positivos pelo método de Kato-Katz foi de 14,4% enquanto o TF-Test identificou 15,9% de positivos, sendo que esta diferença não se mostrou significativa pelo teste de Qui-quadrado ( $p=0,677$ ). O TF-Test® revelou uma sensibilidade de 44,4% (32/72) e 12 lâminas de Kato-Katz, 40,3% (29/72). Esta diferença também não foi estatisticamente significativa ( $p=0,613$ ).

Tabela 14. Comparação da positividade obtida pelos métodos TF-Test® - 1500mg de 3 amostras - e Kato-Katz - 12 lâminas de uma amostra – 500mg

Resultado	KK 12 L1A		TF-TEST	
	n	%	n	%
Negativo	172	85,6	169	84,1
Positivo	29	14,4	32	15,9
Total	201	100	201	100

## 6.5 Diagnóstico Molecular – Técnica de PCR-ELISA

### 6.5.1 Avaliação da taxa de positividade para infecção com *S. mansoni* utilizando a técnica de PCR-ELISA em uma amostra fecal de 500mg em relação ao “Padrão Ouro”

A técnica da PCR-ELISA detectou 36 participantes positivos quando foram usados 500mg de fezes da primeira amostra. Destes, 11 não foram detectados pelo “Padrão Ouro”. Quarenta e sete positivos foram detectados apenas pelo “Padrão Ouro”,

indicando uma sensibilidade da PCR-ELISA de 34,7%, especificidade de 91,5%, valor preditivo positivo de 69,4% e um valor preditivo negativo de 71,5% (Tabela 15).

Tabela 15. Taxa de Positividade da PCR-ELISA em relação ao “Padrão Ouro”

PCR-ELISA	“Padrão Ouro”	
	Positivo	Negativo
Positivo	25	11
Negativo	47	118
<b>TOTAL</b>	72	129

### 6.5.2 Avaliação comparativa entre os métodos Kato-Katz e PCR-ELISA em relação à mesma amostra de fezes examinada

A técnica da PCR-ELISA foi comparada com uma lâmina de Kato-Katz, que corresponde a 41,7 mg de fezes e com 12 lâminas da mesma amostra que corresponde a 500 mg de fezes ( $41,7\text{mg} \times 12 = 500\text{ mg}$ ). A PCR-ELISA detectou 36 positivos para *S. mansoni*. Destes, 20 apresentaram resultados negativos na técnica de Kato-Katz em doze lâminas (Tabela 16). A sensibilidade relativa da PCR-ELISA em relação a 12 lâminas de Kato-Katz foi de 55,2% apresentando uma especificidade relativa de 88,3%, valor preditivo positivo de 44,4% e um valor preditivo negativo de 92,1%. A proporção de positivos por 12 lâminas de Kato-Katz foi de 14,4% enquanto que a PCR-ELISA identificou 18,0% de positivos sendo que esta diferença não se mostrou significativa ( $p=0,343$ ).

Tabela 16. Comparação entre os métodos PCR-ELISA e Kato-Katz examinando 12 lâminas de uma amostra

		Kato-Katz 12 lâminas (12L x 1ª amostra)		<b>TOTAL</b>
		Positivo	Negativo	
PCR-ELISA	Positivo	16	20	36
(500 mg da 1ª amostra)	Negativo	13	152	165
<b>TOTAL</b>		29	172	201

Em relação a uma lâmina de Kato-Katz da mesma amostra, a sensibilidade relativa da PCR-ELISA foi de 68,8% apresentando uma especificidade relativa de 86,5%, valor preditivo positivo de 30,5% e um valor preditivo negativo de 96,9% (Tabela 17). A proporção de positivos por uma lâmina de Kato-Katz foi de 8,0% enquanto que a PCR-ELISA identificou 18,0% de positivos, esta diferença se mostrou significativa ao teste Qui-quadrado ( $p=0,004$ )

Tabela 17. Comparação entre os métodos PCR-ELISA e Kato-Katz examinando uma lâmina

		Kato-Katz 1 lâmina (1L x 1ª amostra)		TOTAL
		Positivo	Negativo	
PCR-ELISA	Positivo	11	25	36
(500 mg da 1ª amostra)	Negativo	5	160	165
<b>TOTAL</b>		16	185	201

### 6.6 Concordância dos métodos diagnósticos coproscópicos e molecular com o Padrão Ouro

Para verificar a concordância entre os métodos, o índice kappa foi utilizado. Uma lâmina de Kato-Katz apresentou uma concordância *fraca* com o Padrão Ouro ( $kappa= 0,268$ ). Doze lâminas apresentaram uma concordância moderada em relação ao Padrão Ouro (índice kappa = 0,464). Dezoito lâminas de Kato-Katz apresentaram em relação ao Padrão Ouro, uma concordância *excelente* ( $kappa = 0,842$ ). O método de TF-Test® e o Padrão Ouro apresentaram uma concordância moderada ( $kappa = 0,507$ ). A concordância entre o PCR-ELISA e o Padrão Ouro foi *fraca*, mostrando um índice kappa de 0,286 (Tabela 18).

Tabela 18. Concordância diagnóstica dos diferentes métodos em relação ao Padrão Ouro, utilizando o índice kappa (k)

Técnica	Índice <i>k</i>	Classificação <i>k</i>
TF-Test® (1500mg)	0,498	Moderada
Kato Katz (1 lâmina = 41,7mg)	0,268	Fraca
Kato Katz (12 lâminas= 500 mg)	0,464	Moderada
Kato Katz (18 lâminas = 750 mg)	0,844	Excelente
PCR-ELISA (500mg)	0,286	Fraca

### 6.7 Síntese dos resultados de sensibilidade e prevalência dos três métodos diagnósticos

A prevalência da doença e a sensibilidade da técnica de Kato-Katz aumentaram com um aumento de número de lâminas e de amostras examinadas. A técnica da PCR-ELISA apresentou uma prevalência de 18,0%, maior que aquela detectada pelo exame de 12 lâminas de Kato-Katz da mesma amostra, porém sua sensibilidade em relação ao Padrão Ouro foi mais baixa, visto que esta foi realizada com apenas uma amostra. O método de TF-Test® apresentou uma sensibilidade comparável com 12 lâminas de Kato-Katz.

Tabela 19. Sensibilidade e prevalência entre os métodos diagnósticos Kato-Katz, PCR-ELISA e TF-Test®

Técnica	Sensibilidade	Prevalência
“Padrão Ouro”*	100,0% (72/72)	35,8% (72/201)
Kato-Katz (18 Lâminas= 750 mg)	80,6% (58/72)	28,9% (58/201)
PCR-ELISA (500 mg)	34,7% (25/72)	18,0% (36/201)
TF-Test (1500 mg)	44,4% (32/72)	15,9% (32/201)
Kato-Katz (12 Lâminas = 500 mg)	40,3% (29/72)	14,4% (29/201)
Kato-Katz (1 lâmina =41,7mg)	21,8% (16/72)	8,0% (16/201)

\* “Padrão Ouro”: combinação de todos os métodos parasitológicos.

## 6.8 Intensidade de infecção

A carga parasitária da população foi de 4,64 opg, ou seja, uma carga parasitária baixa (1-100opg).

Em geral, a distribuição de participantes segundo a carga parasitária considerando as duas metodologias quantitativas aplicadas, ou seja, “Padrão Ouro”, foi de 70 (97,2%) indivíduos com carga parasitária baixa, entre 1-100 ovos por grama (opg). Um participante positivo (1,3%) apresentou carga parasitária média (156 opg) e outro (1,3%) carga parasitária alta (555 opg).

O opg por método diagnóstico foi avaliado. Para o TF-Test®, todos os 32 participantes positivos apresentavam carga parasitária baixa entre 1 e 100 opg. O método de Kato-Katz analisando 18 lâminas identificou 56 (96,5%) positivos com carga parasitária baixa (1-100 opg), um com carga parasitária média (101-400 opg) e outro com carga parasitária alta (>400 opg).

Tabela 20. Comparação da carga parasitária encontrada pelas técnicas TF-Test® e Kato-Katz (18 lâminas)

Carga Parasitária OPG	Técnica Parasitológica			
	TF-Test®		Kato-Katz	
	(%)	(n)	(%)	(n)
<100	100	32	96,5	56
101-400	–	–	1,7	1
>400	–	–	1,7	1

## 6.9 Prevalências de geohelminhos e protozoários intestinais

Pela combinação de todos os métodos parasitológicos (“Padrão Ouro”), 59 (29,3%) foram positivos para outros geohelminhos. O método de Kato-Katz detectou 53 (26,3%) positivos para ancilostomídeos, 8 (4,0%) positivos para *Enterobius vermicularis* e 3 (1,5%) positivos para *Trichuris trichiura*, sendo um dos três co-infectado com *S. mansoni*. Os demais helmintos não foram detectados (Tabela 21).

Dos 53 participantes infectados com ancilostomídeos 21 apresentaram co-infecção com *S. mansoni* e 4 com *E. vermicularis*. Dois participantes apresentaram tripla infecção com ancilostomídeos, *S. mansoni* e *E. vermicularis*.

Tabela 21. Prevalência de helmintos intestinais entre os 201 participantes das duas localidades trabalhadas

Helmintos	Positivos	Negativos	Prevalência
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	201	0,0
Ancilostomídeos	53	155	26,3%
<i>Enterobius vermicularis</i>	8	193	4,0%
<i>Trichuris trichiura</i>	3	198	1,5%
<i>Taenia</i> sp.	0	201	0,0
<i>Hymenolepis nana</i>	0	201	0,0

Pelo método de TF-Test-1500 mg, dentre os 201 participantes, 6 (3,0%) foram positivos para ancilostomídeos, os demais geohelmintos não foram detectados e 23 (11,4%) foram positivos para *Entamoeba coli*, uma ameba não patogênica, porém sua presença é indicativa de má qualidade da água de consumo.

O TF-Test-500mg detectou 5 (9,2%) positivos para ancilostomídeos dentre os 54 participantes, 2 (3,7%) positivos para *E. vermicularis* e 17 (31,5%) positivos para *E. coli*.

## 6.10 Controle de cura

### 6.10.1 Controle de cura 30 dias após o tratamento

Dos 72 participantes positivos para *S. mansoni* tratados com praziquantel, 69 participaram da avaliação parasitológica 30 dias após o tratamento. Tanto pelo método de Kato-Katz quanto pelo método de TF-Test® não foi detectado nenhum participante positivo para *S. mansoni*.

Em relação aos geohelmintos, o método de Kato-Katz detectou 8 (11,6%) positivos para ancilostomídeos e 2 (2,9%) para *Enterobius vermicularis*. O método

de TF-Test detectou 1 (1,4%) positivo para ancilostomídeo, 1 (1,4%) para *E. vermicularis* e 16 (23,1%) positivos para *E. coli*.

Tabela 22. Taxa de cura para esquistossomose observada 30 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato–Katz e TF-Test®

Técnica	Examinados	Curados	Não-curados	Taxa de cura (%)
Kato–Katz	69	69	0	100
TF-Test®	69	69	0	100

### 6.10.2 Controle de cura 90 dias após o tratamento

Dos 72 participantes positivos para *S. mansoni* tratados com praziquantel, 67 participaram da avaliação parasitológica 90 dias após o tratamento. Entre estes foram detectados 3 (4,5%) participantes positivos para *S. mansoni* pelo método de Kato-Katz e 16 (23,8%) foram positivos para ancilostomídeos, 1 (1,5%) positivo para *E. vermicularis* e nenhum para outro geohelminto. O método de TF-Test® não detectou nenhum positivo para *S. mansoni*, detectou 2 (3,0%) positivos para ancilostomídeos e nenhum para outro geohelminto. Dezesesseis (23,8%) foram positivos para *E. coli*.

Tabela 23. Taxa de cura para esquistossomose observada 90 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato–Katz e TF-Test®

Técnica	Examinados	Curados	Não-curados	Taxa de cura (%)
Kato–Katz	67	64	3	95,5
TF-Test®	67	67	0	100

### 6.10.3 Controle de cura 180 dias após o tratamento

Dos 72 participantes positivos para *S. mansoni* tratados com praziquantel, 61 participaram da avaliação parasitológica 180 dias após o tratamento. Entre estes um

foi positivo para *S. mansoni* por ambos os métodos, sendo o mesmo paciente. Pelo método de Kato-Katz, 6 (10,%) foram positivos para ancilostomídeos e nenhum para outro geohelminto. O método de TF-Test® detectou 2 (3,2%) positivos para ancilostomídeos, 1 (1,6%) para *E. vermicularis* e 17 (27,8%) positivos para *E. coli*.

Tabela 24. Taxa de cura para esquistossomose observada 180 dias após o tratamento pelas técnicas de Kato–Katz e TF-Test®

Técnica	Examinados	Curados	Não-curados	Taxa de cura (%)
Kato–Katz	61	60	1	98,3
TF-Test®	61	60	1	98,3

## 6.11 Prevalência por faixa etária, gênero e localidade

### 6.11.1 Correlação entre faixa etária e prevalência de esquistossomose

Na distribuição da esquistossomose por faixa etária observa-se a maior prevalência (51,9%) entre jovens de 20 a 29 anos, seguido por adultos na faixa etária de 30 a 39 anos (48,3%), idosos (42,9%) (70 anos ou mais), adolescentes (10 a 19 anos) e adultos (50 a 59 anos) com taxas de prevalência de 35,9% e 28,6%, respectivamente (Gráfico 1).



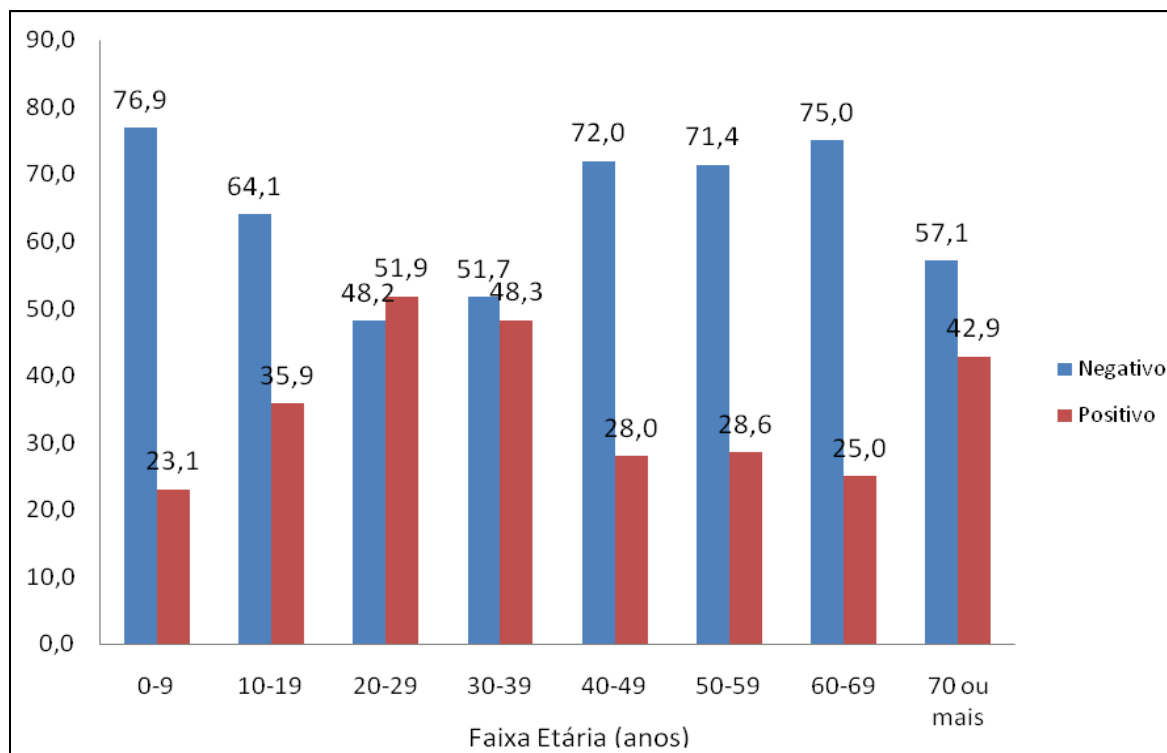


Gráfico 1. Prevalência da esquistossomose relacionada com a faixa etária

### 6.11.2 Comparação da proporção de indivíduos positivos com uma lâmina de Kato-Katz e com o “Padrão Ouro” em relação à faixa etária

O Gráfico 2 ilustra a prevalência da esquistossomose em Pedra Preta (MG) resultante do exame de uma única lâmina de Kato-Katz e o valor obtido para o Padrão Ouro, estratificado por oito faixas etárias. Os achados por uma lâmina mostram taxas de positividade mais elevadas entre adolescentes e adultos jovens, seguido por um decréscimo contínuo na proporção de infectados nos adultos. No caso do valor do “Padrão Ouro”, há como esperado, um aumento geral dos valores para prevalência para cada faixa etária e os altos níveis de prevalência são mantidos dos 10 aos 39 anos. Nas duas situações há um aumento da positividade entre indivíduos acima de 70 anos, que pode ser explicado pelo agrupamento de 3 faixas etárias.

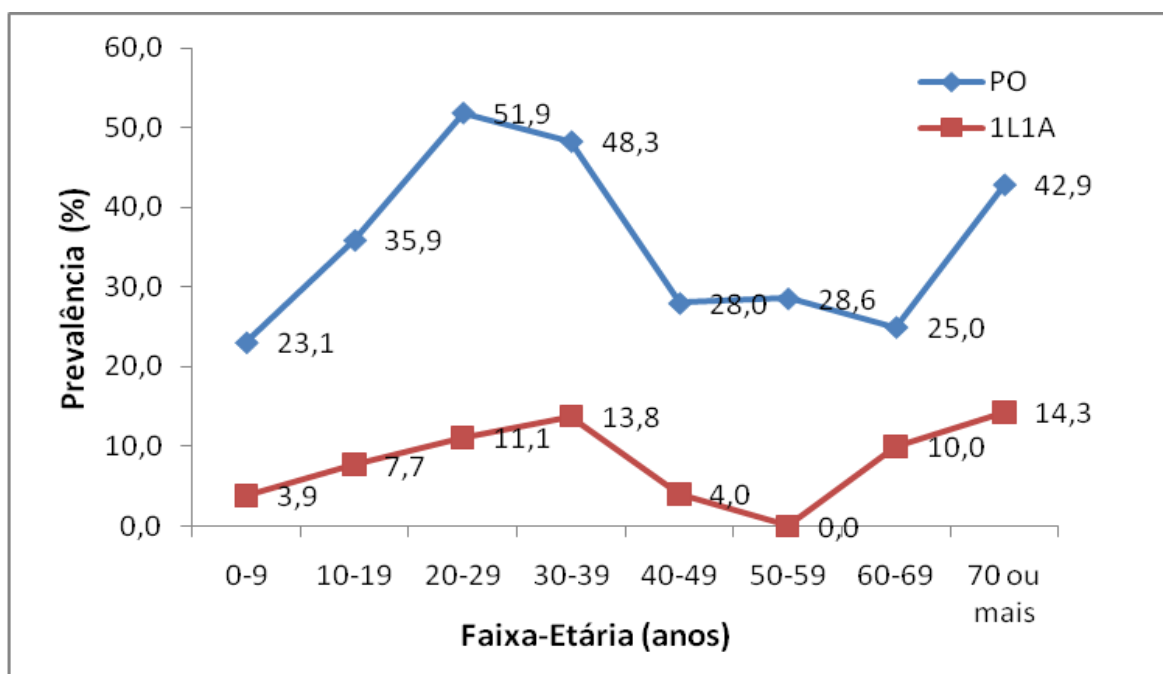


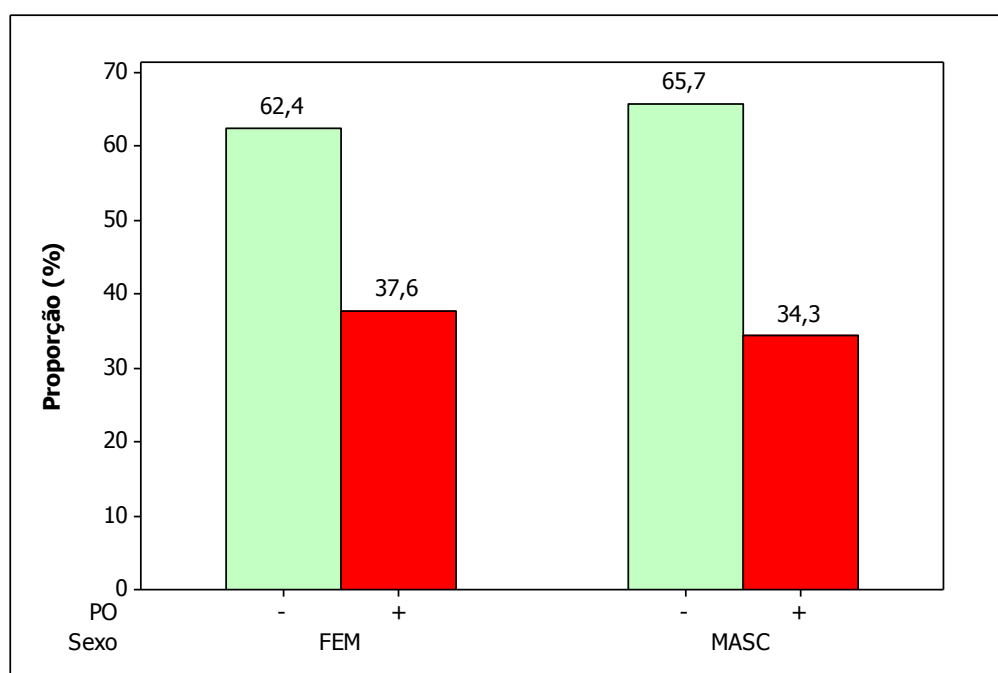
Gráfico 2. Comparação da proporção de indivíduos positivos com uma lâmina de Kato-Katz de uma única amostra com Padrão Ouro em relação a faixa etária.

### 6.11.3 Correlação entre gênero dos participantes e a prevalência de esquistossomose de acordo com Padrão Ouro

Os 201 participantes que completaram as quatro amostras foram constituídos de 108 homens e 93 mulheres (Tabela 25). Em relação à prevalência da esquistossomose, 72 participantes foram positivos para *S. mansoni*, sendo 35 (37,6%) mulheres e 37 (34,3%) homens. Não há diferença estatisticamente significativa da prevalência entre os gêneros ( $p=0,619$ ).

Tabela 25. Número de positivos para esquistossomose, por gênero, na população das localidades estudadas

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
<b>HOMENS</b>	37	71	108
<b>MULHERES</b>	35	58	93
<b>TOTAL</b>	72	129	201



PO = Padrão Ouro; (-) = Negativos ; (+) = Positivos

Gráfico 3. Prevalência da esquistossomose por gênero na população das duas áreas trabalhadas

#### 6.11.4 Correlação entre localidade e a prevalência de esquistossomose de acordo com Padrão Ouro

Dos 201 participantes, 112 eram moradores da localidade de Buriti Seco (BS) e 89 eram moradores da localidade Morro Grande (MG). A localidade de Buriti Seco

apresentou 42 (37,5%) positivos e a localidade de Morro Grande 30 (33,7%). Não houve diferença estatisticamente significativa de prevalência entre as localidades ( $p=0,578$ ) (Gráfico 4).

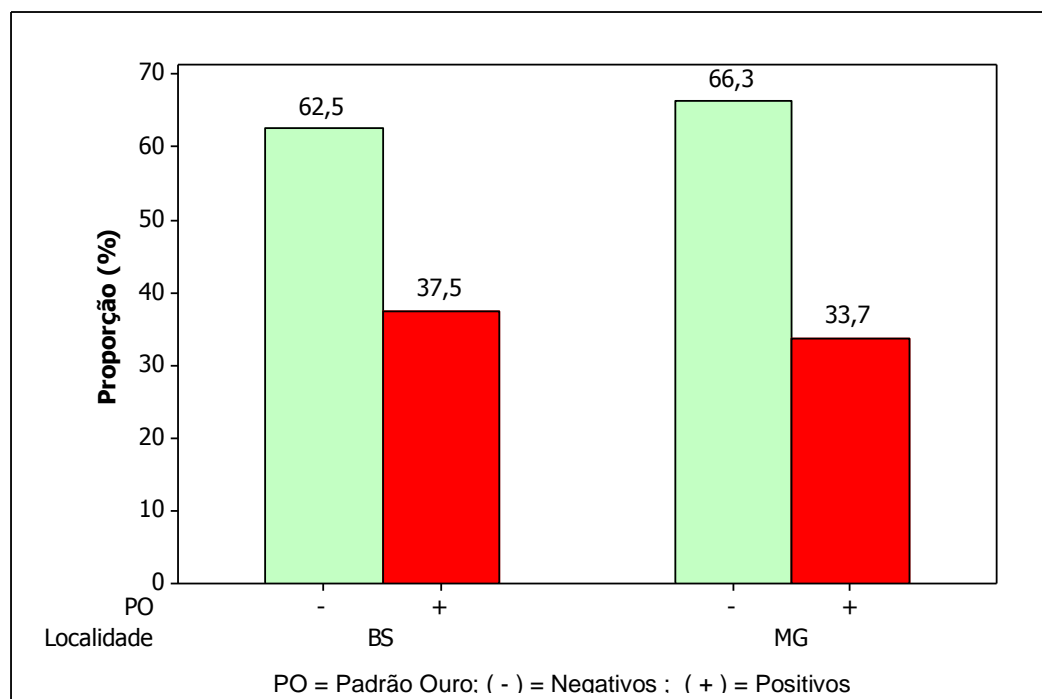


Gráfico 4. Prevalência da esquistossomose nas localidades de Buriti Seco (BS) e Morro Grande (MG) obtida pelo Padrão Ouro

## 6.12 Geoprocessamento da área

Esta ferramenta serve para identificar visualmente as regiões que apresentaram aglomerados significativos, ou seja, a maior concentração de número de casos positivos de esquistossomose e dos geohelmintos. A análise espacial mostra a maior densidade de casos da esquistossomose na localidade de Buriti Seco com 42 positivos, os quais estão mais dispersos. Já na localidade de Morro Grande os 30 casos são mais aglomerados (Figura 20).

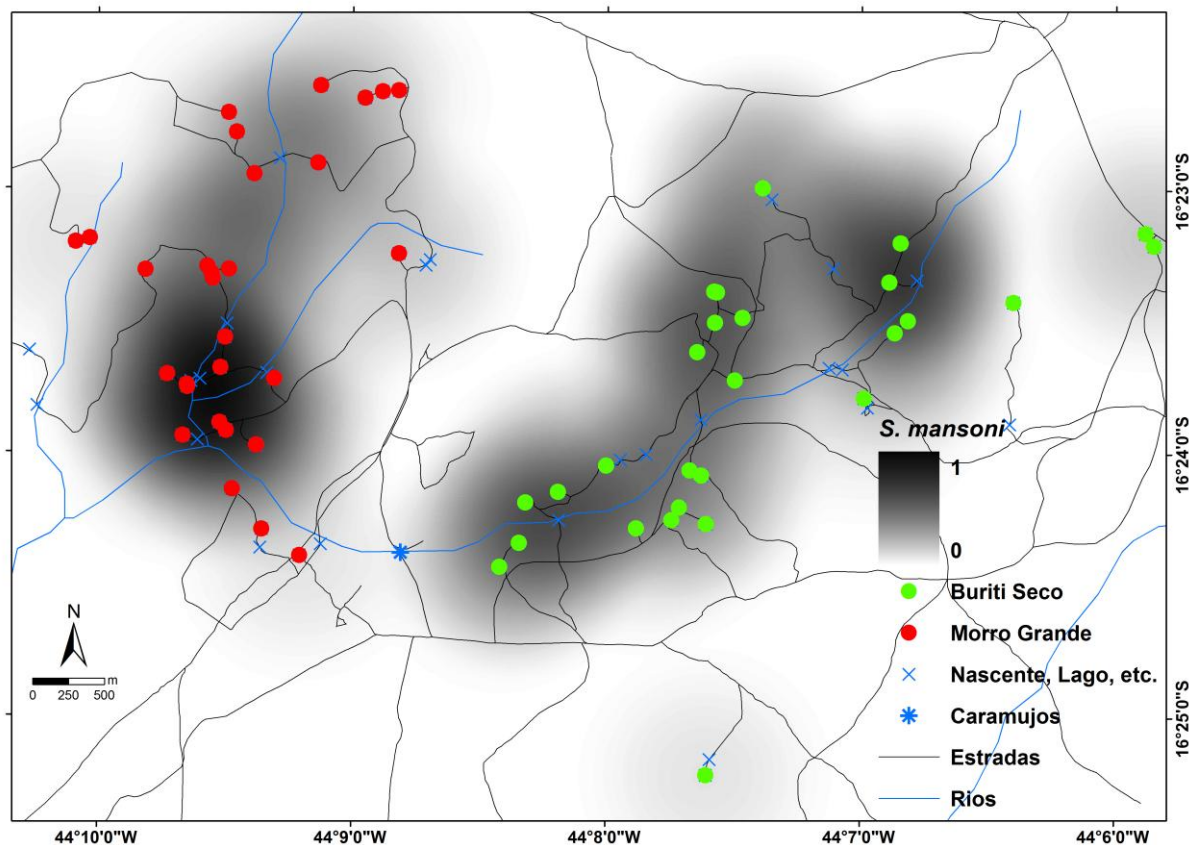


Figura 20. Distribuição dos casos de esquistossomose por área

Pela combinação dos dois métodos parasitológicos 53 participantes foram positivos para ancilostomídeos. A maior densidade de casos foi encontrada na localidade de Morro Grande com 34 positivos, os quais são mais aglomerados. Na localidade de Buriti Seco, os 19 casos restantes se encontram mais dispersos (Figura 21).

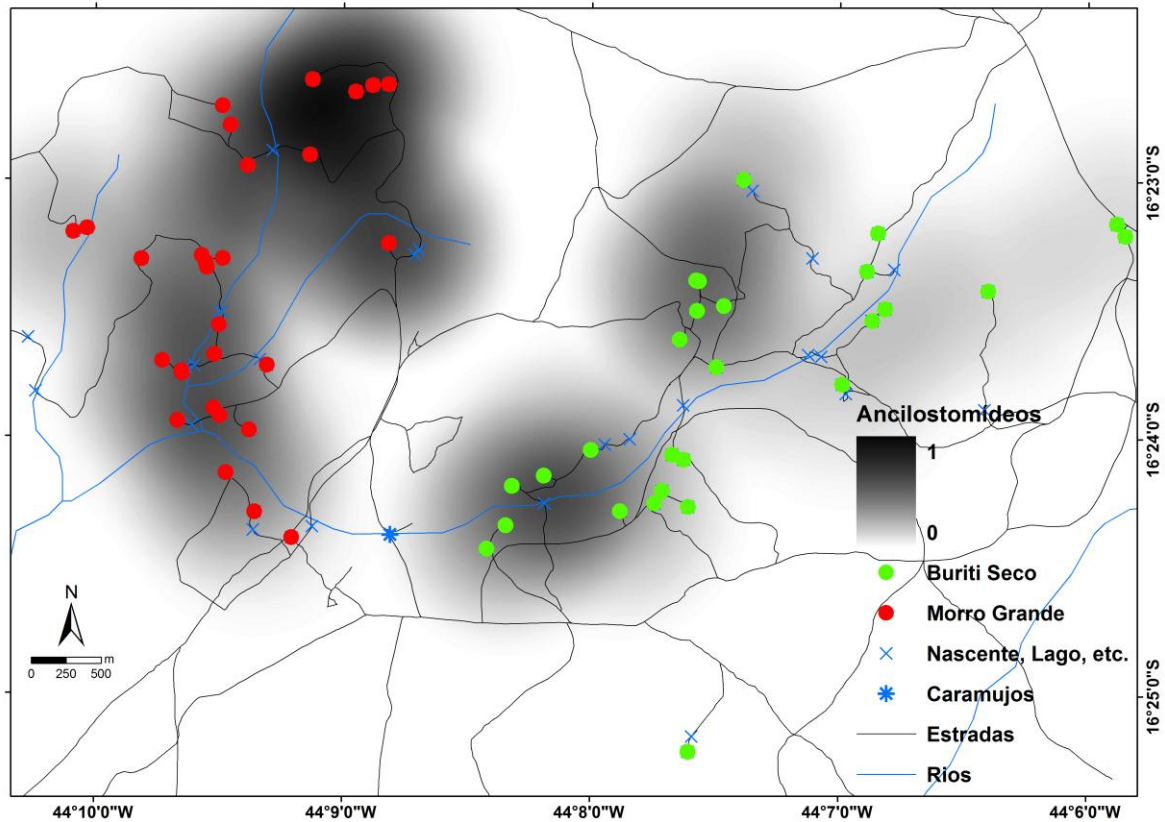


Figura 21. Distribuição dos casos de infecção por ancilostomídeos por área

Os métodos diagnósticos parasitológicos detectaram 8 (4,0%) positivos para *E. vermicularis*. Sete destes casos eram moradores da localidade Morro Grande e um da localidade Buriti Seco.

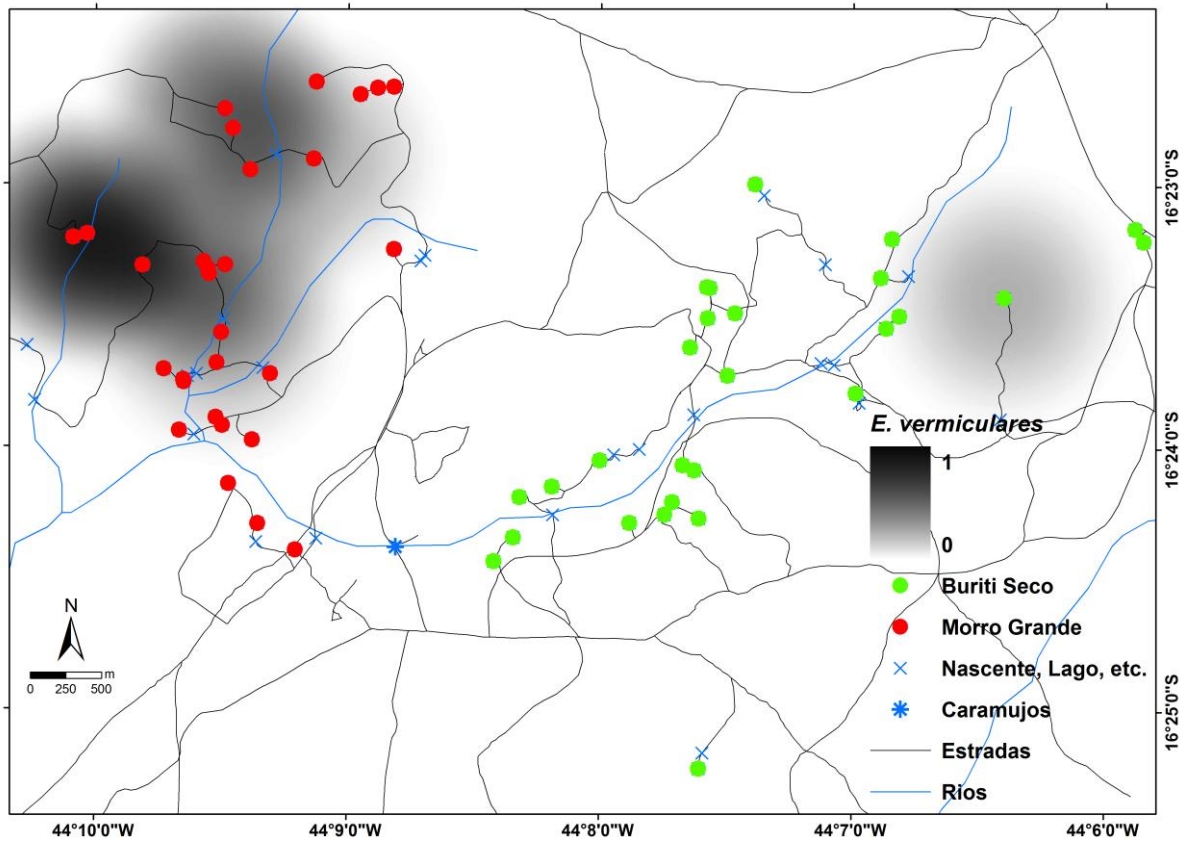


Figura 22. Distribuição dos casos positivos para *Enterobius vermicularis*

Três (1,5%) participantes foram positivos para *T. trichiura* pela combinação dos dois métodos diagnósticos. Dois destes eram provenientes da comunidade de Morro Grande e um da comunidade de Buriti Seco.

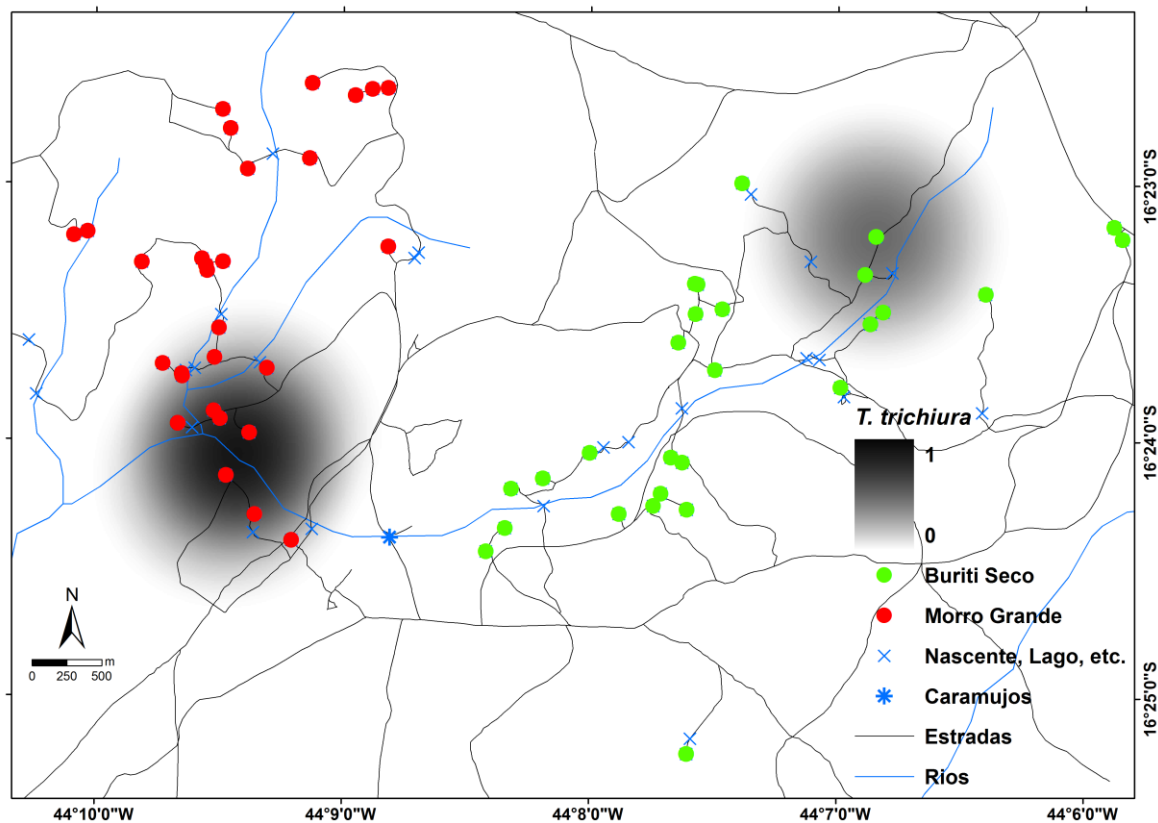


Figura 23. Distribuição dos casos positivos para *Trichuris trichiura*



## 7 Discussão

Sendo a esquistossomose um problema de saúde pública importante é de fundamental interesse o desenvolvimento de métodos diagnósticos simples, de baixo custo e eficientes que possam ser utilizados em larga escala, sobretudo em trabalhos de campo (Ferreira *et al.*, 1966). Por outro lado, a decisão para o tratamento individual, o estudo da morbidade devido à esquistossomose, a identificação rápida de comunidades com elevado risco de infecção, a avaliação de cura ou reinfecção após quimioterapia, o monitoramento de programas de controle são ações que dependem primordialmente dos resultados de testes diagnósticos mais acurados e eficazes (Utzinger, 1999).

O diagnóstico convencional da infecção por *S. mansoni* é realizado pela visualização microscópica dos ovos do parasita nas fezes. A técnica de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) é recomendada para o diagnóstico da esquistossomose por ser quantitativa, ter baixo custo e facilidade de execução (WHO, 1993). Entretanto, em indivíduos com baixas cargas parasitárias, é difícil detectar ovos nas amostras de fezes devido ao pequeno número de ovos eliminados e a variação da eliminação diária destes e, além disso, pelo exame ser baseado em uma única lâmina com pequena quantidade de amostra, aproximadamente 41,7 mg de fezes (Kongs *et al.*, 2001). Este procedimento adotado pelos programas de controle da esquistossomose resulta numa subestimativa da prevalência real, particularmente em áreas com baixa transmissão em indivíduos com baixa carga parasitária (Gonçalves *et al.*, 2006; Enk *et al.*, 2008). É cientificamente bem documentado que a presença de ovos de *S. mansoni* em uma amostra de fezes varia mais entre dias diferentes do que entre lâminas, indicando que o exame de fezes obtido de amostras de múltiplos dias seria ideal para se estimar a prevalência com maior acurácia (Utzinger *et al.*, 2001). Assim, exames de fezes negativos com poucas amostras e lâminas não descartam definitivamente a possibilidade de serem resultados falso-negativos.

Berhe *et al.* (2004), em estudo realizado na Etiópia, compararam os resultados obtidos pela análise de uma, três e cinco lâminas de Kato-Katz preparadas de uma única amostra fecal. A prevalência da infecção por *S. mansoni* baseada em uma lâmina foi de 31,3%, em três 45,7% e em cinco lâminas 52,1%.

No presente estudo, foi demonstrado situação semelhante aquela encontrada por Berhe *et al.*, 2004. Em uma lâmina de Kato-Katz da primeira amostra foram

detectados 16 positivos (8,0%), em três lâminas 9,5%, em seis 12,4% e em 12 lâminas 14,4%.

No nosso estudo, uma amostra examinada por 12 lâminas apresentou 14,4% de positividade, duas amostras 15,4%, três 26,4% e quatro amostras 28,9% de positividade. Pelos resultados obtidos, se o método diagnóstico de escolha é o parasitológico, a análise de três amostras fecais seria o recomendado, devido à existência da variação do número de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes em diferentes dias (Barreto et al., 1990; Engels et al., 1996; Kongs et al., 2001, Enk et al., 2008). Porém, esta recomendação certamente irá gerar problemas logísticos importantes para inquéritos em larga escala.

Em estudo realizado por Enk *et al.*, 2008, no distrito de Chonim de Cima, Governador Valadares, MG, utilizando o método de Kato-Katz associado ao método de Blagg et al. (1955), foi observado um aumento da prevalência de 13,8% (obtida com uma lâmina pelo Kato-Katz) para 35,4% na associação dos dois métodos.

Em nosso caso, na comparação da prevalência obtida com uma única lâmina pelo método de Kato-Katz (procedimento de rotina dos programas de controle) com a soma de todas as amostras e lâminas examinadas pelo mesmo método de Kato-Katz e o método de TF-Test, sendo este conjunto denominado “Padrão Ouro”, observou-se um aumento da prevalência de 8,0% para 35,8% na população, ou seja, um aumento de 4,5 vezes. Nossos resultados confirmam os dados obtidos por Enk *et al.*, 2008, indicando que a prevalência da esquistossomose, obtida com uma lâmina de Kato-Katz, tem sido significativamente subestimada em áreas consideradas de baixa endemicidade.

Além disso, o gráfico 2 revela na comparação entre uma lâmina de Kato-Katz e o Padrão Ouro, que a distribuição da prevalência, estratificada por faixa etária não segue o modelo de curva de prevalência padrão, na qual observa-se um pico na infância e em adultos jovens, seguido por um significativo decréscimo com o aumento da idade. Nossos dados mostram altos níveis de prevalência continuando durante a vida adulta. A explicação provável para isso é o aumento da sensibilidade obtida pelo Padrão Ouro que permite identificar casos de esquistossomose com baixa intensidade de infecção que ocorrem nesta faixa etária, que não eram detectados com uma lâmina. O aumento dos casos acima de 70 anos pode ser um aumento artificial devido ao pequeno número de participantes pertencentes a esta faixa etária.

No presente estudo, avaliamos o método TF-Test® em comparação com o método de Kato-Katz. Em estudo realizado por Gomes *et al.*, (2004) foi demonstrado que em situações de carga parasitária alta a técnica de TF-Test® apresentava resultados comparáveis aos da técnica de Kato-Katz com uma lâmina, já em cargas parasitárias abaixo de 100 opg, a positividade era maior que a técnica de Kato-Katz. Os autores relatavam que a perda de sensibilidade ocorrida na técnica de Kato-Katz seria devido à técnica em si, que utiliza pequena quantidade de material fecal (41,7mg de fezes) contra aproximadamente 4,0 gramas utilizadas por estes autores no TF-Test®.

Os dados neste estudo mostram uma outra perspectiva em relação aos de Gomes *et al.*, (2004). A sensibilidade, assim como a taxa de positividade do TF-Test® na comparação com 12 lâminas de Kato-Katz de uma única amostra, com 6 lâminas de 3 amostras (duas de cada) e com 3 lâminas de 3 amostras (uma de cada), não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Vale ressaltar que esse número de lâminas de Kato-Katz equivale a 500 mg (12 x 41,7mg), 250 mg (6 x 41,7mg) e 125 mg (3 x 41,7mg) respectivamente, contra 1500 mg de material fecal de três amostras usado no TF-Test®. Assim, para avaliarmos a sensibilidade de ambas as técnicas utilizando a mesma quantidade de material fecal da mesma amostra, efetuamos a análise de uma amostra aleatória de 54 participantes em que o TF-Test® foi realizado com 500 mg de material. Os resultados obtidos mostram uma sensibilidade de 40% para o TF-Test e uma sensibilidade de 80% para o método de Kato-Katz.

Além da carga parasitária ser um fator limitante no uso do TF-Test, alguns outros aspectos merecem ser discutidos. Apesar do uso de aproximadamente 1500 mg de fezes para o método de TF-Test® e 750 mg de fezes para 18 lâminas de Kato-Katz (41,7 mg por lâmina), este último apresentou uma sensibilidade de 80,6%. No método de Kato-Katz as fezes são clarificadas sem qualquer diluição, enquanto no TF-Test®, embora a quantidade de material seja duas vezes maior, provavelmente perdem-se formas parasitárias durante seu processamento, nas seguintes etapas: na diluição com formol a 10%; no uso do acetato de etila como desengordurante, visto que há a formação de uma camada sobrenadante de  $\pm 0,5$ cm de espessura, composta de restos fecais misturados com detritos de gordura que é sempre desprezada (Mendes *et al.*, 2005). Os detritos fecais na lâmina analisada no TF-Test® são maiores o que dificulta a visualização dos ovos de helmintos, contribuindo assim para sua perda de sensibilidade. Vale também ressaltar que em

média foram utilizadas 10 lâminas e uma hora para leitura de todo o sedimento por indivíduo, ou seja, para executar o método de forma quantitativa este se apresenta pouco prático devido ao tempo gasto para a microscopia. Deve-se lembrar que o emprego do TF-Test® requer um laboratório com centrífuga especial que tem que ser adquirida, além da compra de kits mais caros e outros suprimentos básicos que a técnica exige. Esses fatores podem ser limitantes para sua aplicação em trabalhos de campo, se comparada com a estrutura necessária quando o método de escolha é o Kato-Katz.

Porém o método de Kato-Katz apresenta também algumas limitações, dentre elas a impossibilidade de execução do método em amostras diarréicas, a não detecção de cistos de protozoários e larvas de helmintos, e a baixa reprodutibilidade entre amostras e entre lâminas diferentes de um mesmo indivíduo e entre leituras de examinadores diferentes (Kongs *et al.*, 2001). Outra limitação está na análise de múltiplas lâminas, pois a realidade dos serviços de controle desta endemia é execução de uma lâmina de Kato-Katz por indivíduo. Para fins epidemiológicos, repetidos exames tornam-se impraticáveis e não são economicamente viáveis. Em áreas de prevalência inferior a 10% ou em indivíduos com cargas parasitárias baixas deve-se estudar a viabilidade da combinação de metodologias que revelem valores mais próximos da prevalência real da esquistossomose.

A decisão por qual método diagnóstico adotar dependerá do objetivo que se almeja alcançar, se o objetivo é a redução da transmissão ou, se é a redução da morbidade. Neste caso, os aspectos econômicos deverão ser considerados. O custo estimado do exame de fezes pelo método de Kato-Katz é de US\$ 0.3/pessoa (sem incluir os custos operacionais: treinamento de pessoal, frascos de coleta e microscópios) (Rabello, 1997).

Devido à possibilidade de resultados falso-negativos, especialmente relacionados à baixa intensidade de infecção, melhorias no diagnóstico são necessárias, tais como o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos alternativos como imunoenaios para detecção de anticorpos ou antígenos de *S. mansoni* e métodos diagnósticos moleculares como a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

A escolha de um método molecular para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em áreas endêmicas irá depender de vários fatores, dentre eles a disponibilidade de infra-estrutura laboratorial e o custo-benefício. A técnica do PCR-ELISA foi avaliada e os resultados encontrados foram animadores. Apesar do custo

relativamente alto que a técnica apresenta, esta se mostrou uma ferramenta valiosa para o diagnóstico da esquistossomose, podendo esta ser aplicada na comparação de métodos diagnósticos e muito útil na confirmação de casos suspeitos que não foram detectados pelos métodos parasitológicos convencionais, e na avaliação do controle de cura após o tratamento quimioterápico.

A técnica de PCR apresentou uma taxa de positividade de 18,0%, maior que 12 lâminas de Kato-Katz com 14,4%. Entretanto, 13 participantes com ovos em suas fezes (diagnosticados pelo método de Kato-Katz) não foram identificados pela PCR. Destes 13, seis mostraram resultados positivos na eletroforese do amplificado em gel. Os sete restantes permaneceram negativos, o que pode ser explicado pela ausência de ovos nas amostras examinadas pela PCR ou ainda pela inibição da amplificação causada por falha na extração, considerando que 5 pacientes apresentavam baixas cargas parasitárias e 2 casos com opg alto. A PCR-ELISA detectou 20 positivos, que 12 lâminas de Kato-Katz não identificaram, destes 5 tornaram-se positivos em amostras subseqüentes analisadas pelo método de Kato-Katz. O TF-Test confirmou mais 4 destes 20 positivos, sobrando 11 casos sem confirmação devido as razões mencionadas acima, ou seja, a ausência de ovos no material fecal.

Resultados similares foram apresentados por Rabello *et al.* (2002) e Pontes *et al.* (2003) utilizando a PCR convencional por visualização em eletroforese em gel. Eles relataram que em 194 participantes estudados, 16 indivíduos com PCR positiva não apresentaram ovos nas fezes, enquanto dois participantes positivos pelo método de Kato-Katz foram negativos na PCR. Pontes *et al.* (2003) explicam que os casos positivos não detectados pela PCR, podem ocorrer na reação de amplificação do DNA devido a vários fatores, dentre eles a inibição da amplificação por compostos fecais e/ou degradação do DNA durante o transporte do campo para o laboratório, ou ainda devido a ausência de ovos na amostra analisada.

Em estudo realizado por Gomes *et al.*, 2010, a técnica de PCR-ELISA aplicada em amostras de fezes de 206 participantes de área endêmica e comparada com 12 lâminas de Kato-Katz de uma única amostra, revelou uma sensibilidade de 97,4% e uma especificidade de 85,1%, ambas mais altas do que obtidas no presente estudo. Esta diferença pode ser justificada, como já descrito, principalmente por falha da extração do DNA nas amostras deste trabalho. Isto reforça a necessidade de técnicos bem treinados aplicando rigorosamente as medidas de controle de qualidade em todas as etapas da reação, para também evitar resultados falso-

positivos causados por contaminação. Outro aspecto que pode resultar em falha da extração seria a qualidade de reagentes de lotes diferentes que foram utilizados.

Cabem aos gestores dos programas de controle em áreas de baixa transmissão decidir entre a realização de múltiplas amostras pelo método de Kato-Katz ou de uma única amostra para a PCR-ELISA para detectar o maior número de infectados. Sendo o primeiro método menos oneroso e último mais acurado. Considerando somente reagentes, o custo da PCR-ELISA é de US\$10 (ou R\$ 17,00) por amostra fecal (Gomes *et al.*, 2010), podendo o custo cair muito quando produzida em larga escala. Além disso, a técnica de PCR-ELISA apresenta boa precisão (reprodutibilidade e repetibilidade), é gênero-específica e possui potencial para estimar a carga parasitária que correlaciona com valores de ovos/grama de fezes determinados pela técnica de Kato-Katz.

Com o aumento da sensibilidade diagnóstica dos métodos, um maior número de infecções com baixa carga parasitária é detectado. O número de ovos por grama de fezes destes indivíduos é reduzida. Isto faz com que a interpretação deste parâmetro dificulte a medida da intensidade de infecção na população, porque um método menos sensível identifica todos os indivíduos com carga parasitária alta e média, mas somente poucos com baixa intensidade de infecção, resultando numa superestimação desse parâmetro (Engels *et al.*, 1996; Enk *et al.*, 2008). Em nosso estudo, a intensidade de infecção na população foi 4,64 opg. A intensidade de infecção individual foi em 70 indivíduos baixa (1-100 opg), em um indivíduo média (156 opg) e em outro a intensidade de infecção foi alta (555 opg).

Em relação à distribuição da esquistossomose por gênero não houve predominância de um gênero sobre o outro para o risco de infecção. Foram positivas 35 pessoas (17,4%) do gênero feminino e 37 (18,4%) do gênero masculino, indicando que a infecção com esquistossomose nesta população não é relacionada com o gênero.

A avaliação do controle de cura 30, 90 e 180 dias após o tratamento pelos métodos de Kato-Katz e TF-Test nos participantes positivos, revelou que, como já muito bem descrito, o tratamento não cura todos os tratados e por si só não impede reinfeções e, conseqüentemente não interrompe a transmissão. Neste estudo, houve uma redução dos infectados, com uma taxa de cura de 100% 30 dias após o tratamento, 95,5% de cura 90 dias após tratamento e 98,6% de cura 180 dias após o tratamento, sendo os positivos detectados em cada etapa novamente tratados. A taxa de cura normalmente esperada com o uso de praziquantel é de 60–90%. Estas

elevadas taxas de cura não eram esperadas visto que foi realizada uma minuciosa prospecção da infecção, que provavelmente detectaria as menores cargas parasitárias. Os positivos remanescentes são em tão baixo número que talvez não exista “massa crítica” suficiente de doadores de ovos para manter uma eficiente cadeia de transmissão. Além disso, estes casos positivos após o tratamento podem ser resultantes de falha terapêutica.

O geoprocessamento é uma ferramenta utilizada para direcionar os esforços e estratégias de controle, pois permite o mapeamento das áreas e o acompanhamento destas em estudos longitudinais e de vigilância epidemiológica. Na área de estudo, podemos notar que em relação à esquistossomose a maioria dos casos foi encontrada na localidade de Buriti Seco, sendo estes casos mais dispersos. Em relação aos geohelmintos, a maior densidade de casos foi encontrada na localidade de Morro Grande. Apenas três espécies de helmintos foram detectadas: ancilostomídeos, *E. vermicularis* e *T. trichiura*. Especialmente os aglomerados de *T. trichiura* e *S. mansoni* estão localizados nesta mesma área.

Fato interessante é a baixa prevalência de *Ascaris lumbricoides* e de outros helmintos registrada nas áreas endêmicas de Minas Gerais (Massara et al., 2004, Enk et al., 2008). Em nosso caso, a presença do primeiro helminto não foi detectada e a dos outros mostrou baixa prevalência. Uma possível explicação para essa redução ao longo das décadas seria o sucesso obtido pelas campanhas de controle das geohelmintoses que utilizam o tratamento anti-helmíntico em larga escala, visto que este parasito apresenta elevada produção de ovos por casal (200.000/dia) e assim praticamente todas as infecções são detectadas nos exames parasitológicos convencionais. Outra explicação seria devido às melhorias das condições sanitárias e no abastecimento com água potável.

Como descrito neste estudo, existem vários métodos que podem ser empregados no diagnóstico da esquistossomose, porém todos eles apresentam problemas ligados a sensibilidade ou especificidade. A técnica ideal, que combine altas taxas de sensibilidade e de especificidade com baixo custo e fácil aplicabilidade, inclusive no campo, ainda não foi encontrada.

Uma estratégia que poderia ser viável seria combinar diferentes metodologias parasitológicas para identificar casos com baixa intensidade de infecção. Outra combinação sugerida por Rabello & Enk (2005) seria uma triagem com detecção de anticorpos e confirmação com múltiplos exames parasitológicos nos casos positivos.

Finalmente, este estudo reforça a abordagem de combinar técnicas diagnósticas para áreas de baixa transmissão com o objetivo de aumentar a probabilidade de detectar indivíduos com cargas parasitárias baixas, evitando que “falsos negativos” continuem fornecendo ovos que darão continuidade ao ciclo de transmissão da doença na área.



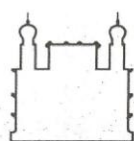
## **8 Considerações finais**

Na comparação da prevalência obtida com uma única lâmina pelo método de Kato-Katz (metodologia adotada pelos programas de controle da doença no Brasil) com a soma de todas as amostras e lâminas examinadas pelo método de Kato-Katz e o método de TF-Test® (combinação definida como “Padrão Ouro”) observou-se um aumento da prevalência de 8,0% para 35,8% na população, ou seja, um aumento expressivo de 4,5 vezes. Este estudo confirma os dados obtidos por Enk et al., 2008, e reforça que a prevalência da esquistossomose, obtida com uma lâmina de Kato-Katz, tem sido significativamente subestimada em áreas consideradas de baixa endemicidade.

Os resultados obtidos com a PCR-ELISA apontam para o desenvolvimento de um método diagnóstico promissor que utiliza somente uma única amostra de fezes e que pode representar importante avanço para dar suporte aos estudos epidemiológicos e para o controle de cura da doença, especialmente quando seus custos forem reduzidos pela produção em escala industrial.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



#### MEMORANDO Nº 18/2010 CEP – CPqRR / FIOCRUZ

Belo Horizonte, 01 de Março de 2010

Para: Paulo Marcos Zech Coelho  
Pesquisador Responsável do Protocolo CEP- CPqRR Nº 03/2008

De: Dr. João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do Comitê de Ética do CPqRR

Assunto: Aprovação de Relatório de Progresso e pequenas alterações.

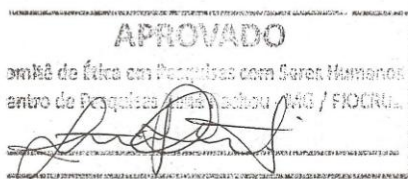
Prezado Dr. Paulo,

Informamos que recebemos no CEP – CPqRR em 01 de Fevereiro de 2010, referente ao Protocolo Nº 03/2008 CEP – CPqRR, Carta de Aprovação – PARECER CEP Nº 14/2008, PARECER CONEP Nº 784/2009; coordenado por V.S. para apreciação o Relatório de progresso do estudo: "Avaliação de novas técnicas para detecção de *Schistosoma mansoni* em pacientes de áreas de baixa endemicidade".

O projeto segue sendo realizado, tendo como alteração da proposta original a mudança da localidade para Pedra Preta, também no município de Montes Claros, pois, de acordo com os relatos da equipe de pesquisa, os pacientes foram tratados para esquistossomose, inviabilizando a realização do trabalho. Este fato ocorreu devido à demora na provação do projeto pelo CEP/CONEP. A escolha da nova área levou em consideração os critérios de baixa taxa de migração da população local, e pela prevalência de 12% da endemia, de acordo com a UNASA/Montes Claros. Este dado merece ser revisto e adequadamente referenciado, uma vez que a FUNASA são executa mais a atividade de controle de endemias desde a implantação definitiva do SUS.

As atividades desenvolvidas foram exame parasitológico de fezes, coleta de sangue e questionário sócio-econômico envolvendo em torno de 200 pessoas. Os indivíduos infectados foram tratados. Como o trabalho foi realizado primeiro na área urbana, o controle de cura nesta área encontra-se praticamente finalizado. A previsão para o término do projeto é para março de 2011, e não está atrasado. Diante disso, recomendo a aprovação deste relatório parcial de acompanhamento do projeto.

Situação: **APROVADO.**



Atenciosamente,

  
João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do CEP/SH-CPqRR  
Dr. João Carlos Pinto Dias  
COORDENADOR  
COMITÊ DE ÉTICA

Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto 30190-002, Belo Horizonte – MG - Brasil  
Tel.: 55 0xx31 3295 3566 (ramal 181) Fax: 55 0xx31 3295 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

## 9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A equipe de Pesquisadores do projeto: "Avaliação de novas técnicas para detecção de *Schistosoma mansoni* em pacientes de áreas de baixa endemicidade" convida o Sr. (a):

para participar do projeto mencionado acima.

#### **Equipe responsável:**

Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.  
Martin Johannes Enk (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7747.  
Sandra Costa Drommond (Secretaria Estadual de Saúde – Minas Gerais) Tel.: (31) 3261 4745  
Nidia Francisca de Figueiredo Carneiro (Secretaria de Saúde de Montes Claros) – Tel.: (38) 8823 2636.  
Para maiores esclarecimentos entre em contato conosco.

#### **- Informações Gerais:**

A Esquistossomose (xistose, barriga d'água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. Em alguns casos pode produzir barriga d'água e sangramentos (no vômito e nas fezes). Estes casos felizmente são raros porque hoje existem medicamentos que curam a maioria dos doentes.

#### **- Descrição da Pesquisa**

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

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

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

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

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

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

*E-mail: coelhopm@cpqrr.fiocruz.br*



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

**Permissão para revisão dos dados (confidencialidade):** Todas as informações serão confidenciais, ficando restritas aos pesquisadores, e a qualquer momento, a você, se assim desejar.

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


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

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

Nome do participante

Ass. do participante

Paulo Marcos Zech Coelho  
Nome do Pesquisador

  
Ass. do Pesquisador

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

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





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

---

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

A equipe de Pesquisadores do projeto: “*Avaliação de novas técnicas para detecção de Schistosoma mansoni em pacientes de áreas de baixa endemicidade*” convida o menor de idade:

---

para participar do projeto mencionado acima.

**Equipe responsável:**

Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7740.  
Martin Johannes Enk (CPqRR / FIOCRUZ – Ministério de Saúde) – Tel.: (31) 3349 7747.  
Sandra Costa Drommond (Secretaria Estadual de Saúde – Minas Gerais) - Tel.: (31) 3261 4745.  
Nidia Francisca de Figueiredo Carneiro (Secretaria de Saúde de Montes Claros) ) – Tel.: (38) 8823 2636.  
Para maiores esclarecimentos entre em contato conosco.

**- Informações Gerais:**

A Esquistossomose (xistose, barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contêm caramujos infectados. Em alguns casos pode produzir barriga d’água e sangramentos (no vômito e nas fezes). Estes casos felizmente são raros porque hoje existem medicamentos que curam a maioria dos doentes.

**- Descrição da Pesquisa**

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

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

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

---

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

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

E-mail: marenk@cpqrr.fiocruz.br



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

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

**Permissão para revisão dos dados (confidencialidade):** Todas as informações serão confidenciais, ficando restritas aos pesquisadores, e a qualquer momento, a você, se assim desejar.

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

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

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

Nome do responsável

Ass. do responsável

Paulo Marcos Zech Coelho

Nome do pesquisador

*Paulo Marcos Zech Coelho*  
 Ass. do pesquisador

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

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

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

E-mail: [marenk@cpqrr.fiocruz.br](mailto:marenk@cpqrr.fiocruz.br)

### 9.3 Convite para submissão de artigo no Suplemento da Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

XII International Symposium on Schistosomiasis - Memórias

Quarta-feira, 2 de Março de 2011 10:00

De: "Memórias IOC" <memorias@ioc.fiocruz.br>  
Para: lilimvs@yahoo.com.br



**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**  
A revista científica de maior impacto da América latina



Dear Dr(a). LILIANE MARIA VIDAL SIQUEIRA,

The *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* is organizing a special issue entirely devoted to schistosomiasis studies to be published in 2011. As you probably know, the publication of this special issue has been considered since the **XII International Symposium on Schistosomiasis**, held in Brazil in October 2010.

This issue has been planned to publish high quality research performed by selected invited authors on several fields of schistosomiasis research. We shall put emphasis on recent advances and future scientific challenges concerned to schistosomiasis.

We are pleased to invite you to submit an original contribution (or a review) entitled: "Evaluation of parasitological diagnostic methods for Schistosomiasis mansoni in low transmission area in Minas Gerais, Brazil." to be published in this special issue of *Memórias*.

Submission of manuscript for this issue should be done through the online submission system at <http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login> under journal section **Xisto 2011** until **April 20th, 2011**. Manuscripts will follow the peer reviewing procedure as usual, although faster and prioritized.

*Memórias* is a centennial, open access international journal published in Brazil, whose impact factor has reached 2.097 in 2009. Instruction for authors and other details are available on our websites [www.memorias.fiocruz.br](http://www.memorias.fiocruz.br).

Please confirm if you wish to accept our invitation by email. If you have any queries concerning the invitation or the submission process, please do not hesitate to contact us.

We welcome to receive your valuable contribution to this issue soon.

Sincerely yours.

Elisa Cupolillo  
Ana Carolina P. Vicente  
Associated Editors invited for this issue

Ricardo Lourenço-de-Oliveira  
Editor in Chief

## 10 Referências bibliográficas

Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari IM, Noya O. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria The Venezuelan experience. *Acta Trop* 2006; 103: 41–49.

Almeida Machado P. The Brazilian Program for Schistosomiasis Control, 1975-1979. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31: 76-86.

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

Araújo AJUS. Utilização do Método de Concentração em Formol-Acetato de Etila na quantificação de ovos de Helmintos e Avaliação de sua Aplicabilidade em inquéritos Epidemiológicos. [Dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2000.

Araújo, N. Associação de Fármacos na Terapêutica Experimental da Esquistossomose mansoni. Orientação: Dr. Naftale Katz. Belo Horizonte: S.N, 2010. 144 p. Capa dura, 30 c., tab., il, graf. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T\\_22.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_22.pdf). Acesso em: 12 jul. 2011.

Bailey TC, Gatrell AC. Interactive spatial data analysis. Longman Group Limited: Essex; 1995.

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

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



---

Beck L, Van-Lüme DSM, Souza JR, Domingues ALC, Favre T, Abath FGC, Montenegro SML. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. *Acta Trop* 2008; 108, 229–233.

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

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

Carvalho OS, Rocha RS, Massara CL, Katz N. Expansão da esquistossomose mansoni em Minas Gerais. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1987; Vol. 82, Suppl. IV: 295-298.

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

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000, 77: 41–51.

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol Today* 1993; 9: 162-6.

Correa-Oliveira R, Dusse LMS, Viana IRC, Colley DG, Carvalho OS, Gazzinelli G. Human antibody response against schistosomal antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 348-355.

Coelho PMZ, Andrade ZA, Borges, CMC, Ribeiro F, Barbosa L. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. P.147-160.

---

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

Couto FFB, Coelho PMZ, Araújo N, Katz N, Mattos ACA. Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. Parasitology 2010; 137: 1-7.

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

Deelder AM et al. Detection of schistosome antigen in Mummies. Lancet 1990; 335: 724-725.

Deelder AM et al. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. Exp Parasitol. 1980, New York, 50: (1) 16-32.

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

De Jonge N, Rabello AL, Krijger FW, Kremsner PG, Rocha RS, Katz N, Deelder AM. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85: 756–759.

Diggle PJ. Statistical analysis of spatial point patterns. Oxford University Press: New York; 2003.

Drummond SC, Silva LCS, Amaral RS, Sousa-Pereira SR, Antunes CM, Lambertucci JR. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2006; Vol. 101(Suppl. I): 37-44.

Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med. 1990; Vol. 322: (3) 178-183.

---

Enk MJ, Caldeira RL, Carvalho OS, Schall VT. Rural tourism as risk factor for the transmission of schistosomiasis in Minas Gerais State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004; 99: 105-108.

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

Enk, MJ. Análise crítica da metodologia estabelecida para determinar prevalência e controle de esquistossomose em área de baixa endemicidade (Chonim de Cima, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil); recomendações de novas abordagens integradas. Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, Co-orientação: Dra. Virgínia Torres Schall. Belo Horizonte: [s.n.], 2007. xii, 85 p. il. Tese(Doutorado em Ciências da Saúde)- Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: [http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Tese\\_Martin\\_Johanes\\_Enk.pdf](http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Tese_Martin_Johanes_Enk.pdf). Acesso em: 12 jul. 2011

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

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Trop 2002; 82:139-146.

Fallon PG, Tao L-F, Ismail MM, Bennett JL. Schistosome Resistance to Praziquantel: Fact or Artifact?. Parasitol Today 1996; vol. 12, n. 8, 316-20.

Faust EC, Melency D. Zinc sulphate centrifugal flotation method in diagnosis of parasitic infection. Am J Huf 1924; 3: 218-219.

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

Ferrari TCA, Drummond S, Reis MG. Neuroesquistossomose. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. P. 807-820.

Ferreira LF, Coutinho SG, Argento CA, Andrade CM, Rubens J, Valente P, Silva JR. O diagnóstico parasitológico na esquistossomose mansoni – Estudo comparativo entre o exame de fezes, a biópsia retal e biópsia hepática. O Hospital, 1966, 69: 1.

Gargioni C, Silva RM, Thomé CM, Quadros CMS, Kanamura HY. Utilização de método sorológico como ferramenta diagnóstica para implementação da vigilância e controle da esquistossomose no Município de Holambra, São Paulo, Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2008, 24(2): 373-379.

Gibodat & Bergquist. Post-transmission schistosomiasis: a new agenda. Acta Trop 2000; 77: 3–7.

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

Gomes JF, Hoshino-Shimizu S, Dias LCS, Araújo AJUS, Castilho VLP & Neves FAMA. Evaluation of a Novel Kit (TF-Test) for the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. J. Clin. Lab. Anal. (EUA) 2004; 18(2): 132-138.

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

Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBF, Valar C, Moraes C, Garrido CT, Amaral RS. Identification of a transmission focus of

*Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian state, Rio Grande do Sul. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999; 94:9-10.

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

Guimarães RJ, Freitas CC, Dutra LV, Moura AC, Amaral RS, Drummond SC, Scholte RG, Carvalho OS. Schistosomiasis risk estimation in Minas Gerais state, Brazil, using environmental data and GIS techniques. Acta Trop 2008; 108: 234-241.

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

\_\_\_\_\_. History of Praziquantel. In: Moon A, Smith S. Praziquantel. Stanford: Stanford University, 2006. Disponível em <http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Praziquantel/history.html>

Acesso em: 12 jul. 2011-07-12

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

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

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

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

Katz N, Carvalho OS. Introdução recente da esquistossomose mansoni no sul do estado de Minas Gerais, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1983; Vol. 78 (3): 281-284.

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

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

Katz N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 1999; 32(6): 705-711.

King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. Lancet 2005; 365: 1561–69.

King CH, Sturrock RF, Kariuki HC, Hamburger J. Transmission control for schistosomiasis – why it matters now. Trends In Parasitol 2006; Vol.22 No.12: 575 – 582.

Knight WB, Hiatt RA, Cline BL, Ritchie LS. A modification of the formol-ether concentration technique for increased sensitivity in detecting *Schistosoma mansoni* eggs. Am J Trop Med Hyg. 1976; Vol 25 (6): 818-823.

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

Lima e Costa MF, Guerra HL, Pimenta Junior FG, Firmo JOA, Uchôa E. Avaliação do programa de controle da esquistossomose (PCE/PCDEN) em municípios situados na bacia do Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1996; 29 (2): 117-126.

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

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

Massara CL, Peixoto SV, Barros HS, Enk MJ, Carvalho OS, Schall V. Factors associated with schistosomiasis mansoni in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004, vol.99, suppl.1.

Mendes CR, Teixeira AT, Pereira RA, Dias LC. A comparative study of the parasitological techniques: Kato-Katz and coprotest. Rev Soc Bras Med Trop. 2005, 38: 178-80.

Oliveira EJ, Kanamura HY, Dias LCS, Soares LCB, Lima DMC, Ciaravolho RMC. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. Cad Saúde Pública 2003; 19:255-61.

Oliveira FA, Kusel JR, Ribeiro F, Coelho PMZ. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. Parasitol 2006; 132: 321-330.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro 1975; 55: 105-128.

Pica-Mattoccia L, Carlini D, Guidi A, Cimica V, Vigorosi F, Cioli D. The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2006; 101: 307–312.

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

Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg 2003; 68: 652–656.

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

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

Rabello A & Enk MJ. Progress towards the detection of schistosomiasis. In: Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. Geneva, 14-16, 2005.

Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bull. U.S. Army Med. Dep. 1948; 8:326.

Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, Mcmanus, DP. Katayama syndrome. Lancet Infect. Dis. 2007; 7: 218–224.

Ruffer MA. Remarks on the histology and pathological anatomy of Egyptian mummies. Cairo Scientific Journal 1910b; 4:3-7.

Sandoval N, Siles-Lucas M, Perez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, López-Abán J, Muro A. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. Parasitol 2006; 133: 581–587.

Schall V, Massara CL, Enk MJ, Barros HS, Miranda ES. Os Caminhos da Esquistossomose dentro do nosso corpo. Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou, 2007. 44 p. ISBN: 978-85-99016-09-1. (Série Esquistossomose, n. 8, parte I). Disponível em: <[http://pide.cpqrr.fiocruz.br/arquivos/Partel\\_Ciclo.pdf?PHPSESSID=b92c1c7fe8dad95036c65dcdbc30b44d](http://pide.cpqrr.fiocruz.br/arquivos/Partel_Ciclo.pdf?PHPSESSID=b92c1c7fe8dad95036c65dcdbc30b44d)>. Acesso em: 12 jul. 2011.



Silveira AC. Controle da Esquistossomose no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1989; Suppl.I Vol. 84, 91-104.

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

Schneider MC, Aguilera XP, Barbosa da Silva Junior J, Ault SK, Najera P, Martinez J, Requejo R, Nicholls RS, Yadon Z, Carlos Z, Silva, Leanes LF, Periago MR. Elimination of Neglected Diseases in Latin America and the Caribbean: A Mapping of Selected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(2): e964.

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias - Situação da esquistossomose no Estado de São Paulo. II Encontro sobre Esquistossomose. São Paulo, Imprensa Oficial do Estado, 1982 (Relatório).

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

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

Utzinger J. Novel approaches in the control of schistosomiasis: from rapid identification to chemoprophylaxis. [Tese de Doutorado], Basel, 1999.

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

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Caspar W. N. Looman, Nico J. D. Nagelkerke, J. Dik F. Habbema and Dirk Engels. Quantification of clinical morbidity

associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; 89: 125-139.

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

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

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

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

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl Acetate as a substitute for Diethyl Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Technique. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 10: 852-3.

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

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