



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA EDUARDA DA SILVA PEREIRA

**IMPLANTAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
IMUNOLÓGICO PARA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
BASEADOS EM ELISA PARA DETECÇÃO DE
IMUNOGLOBULINAS (IgM E IgG) HUMANAS**

Recife
2022

MARIA EDUARDA DA SILVA PEREIRA

**IMPLANTAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
IMUNOLÓGICO PARA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
BASEADOS EM ELISA PARA DETECÇÃO DE
IMUNOGLOBULINAS (IgM E IgG) HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Wheverton Ricardo Correia do
Nascimento

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Pereira, Maria Eduarda da Silva.

Implantação de métodos de diagnóstico imunológico para Esquistossomose mansônica baseado em ELISA para detecção de imunoglobulinas (IgM e IgG) humanas / Maria Eduarda da Silva Pereira. - Recife, 2022.

80 p. : il., tab.

Orientador(a): Wheverton Ricardo Correia do Nascimento

Cooorientador(a): Elaine Christine de Souza Gomes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. ELISA. 2. Estudos soropidemiológicos. 3. Testes imunológicos. 4. Imunoglobulinas. 5. Esquistossomose mansoni. I. Nascimento, Wheverton Ricardo Correia do. (Orientação). II. Gomes, Elaine Christine de Souza. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARIA EDUARDA DA SILVA PEREIRA

**IMPLANTAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
IMUNOLÓGICO PARA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
BASEADO EM ELISA PARA DETECÇÃO DE
IMUNOGLOBULINAS (IgM E IgG) HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento
UFPE/ Centro de Ciências Médicas

Dr. Walter Lins Barbosa Junior
Instituto Aggeu Magalhães / Departamento de Parasitologia

Mestre Rodrigo Moraes Loyo Arcoverde
Instituto Aggeu Magalhães / Departamento de Parasitologia

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus que me deu forças, me acompanhou por todos os caminhos até aqui, me permitiu realizar um sonho e nunca me abandonou.

Aos meus pais, toda gratidão que sinto é impossível de colocar em palavras. Ninguém nunca acreditou mais em mim do que eles. Se eu me visse com os olhos dos meus pais eu seria capaz de qualquer coisa.

Ao meu orientador que há quatro anos vem me formando como aluna para finalização dessa primeira etapa na minha vida acadêmica e para muito além disso. Obrigada por toda confiança que me foi passada e por acreditar em mim.

A minha co-orientadora, que uma vez me disse que estava apostando muito em mim e eu nunca esqueci. Sou muito grata por tudo que vivi e aprendi no laboratório.

A Rodrigo, por todas as técnicas ensinadas, pela paciência, pelos ensinamentos científicos e sobre a vida.

Aos meus avós e familiares por toda confiança e orgulho dedicados a mim.

Aos meus amigos por todo apoio, aqueles que viveram com quem fui antes desses cinco anos e continuam aqui me apoiando em todas etapas da minha vida até aqui e os que me conheceram em um momento de transição, me viram conhecer, desconhecer e conhecer novamente quem eu sou, dividiram comigo felicidades, tristezas, experiências, frustrações e conquistas.

A todos os integrantes do Laboratório de Referência em Esquistossomose, desde o acolhimento do primeiro dia até às contribuições para execução deste trabalho.

Aos professores e colegas do Laboratório Central pela contribuição à futura profissional que estou construindo.

A equipe do Real Lab, pelos ensinamentos que tive durante o estágio e que carregarei durante toda minha jornada profissional.

A todos os professores que participaram do meu percurso até aqui.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta com esse trabalho e minha jornada até aqui agradeço da forma mais sincera que é possível.

PEREIRA, Maria Eduarda da Silva. **Implantação de métodos de diagnóstico imunológico para a Esquistossomose mansônica baseado em ELISA para a detecção de Imunoglobulinas humanas**. 2022. 80. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

No Brasil, esquistossomose é uma parasitose causada por trematódeos da espécie *Schistosoma mansoni*. O diagnóstico da doença é baseado, principalmente, no método parasitológico Kato-Katz, entretanto, a técnica apresenta sua sensibilidade reduzida em locais de baixa endemicidade. Sabendo disso, métodos de diagnósticos alternativos são necessários para detecção sensível de indivíduos infectados. Assim, o objetivo do estudo foi desenvolver métodos de diagnóstico para a esquistossomose mansônica baseado na detecção de anticorpos. Foi realizada a produção dos antígenos solúveis dos vermes adultos (SWAP), padronização do método de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção de IgM e IgG específicas contra SWAP,, realização do inquérito epidemiológico com indivíduos de área endêmica para validação do teste de ELISA e correlação dos níveis de imunoglobulinas com a carga parasitária, sexo e idade dos indivíduos. Na análise estatística, foi utilizado teste de Chi-quadrado e teste t não paramétrico Mann-Whitney. Foi obtido um concentrado antigênico de 440 µg/mL para uso nas reações. Durante a padronização, as melhores condições obtidas foram utilizando concentrações do antígeno de 10 µg/mL e diluição dos conjugados de 1:1.000. No inquérito, foram coletadas amostras de fezes de 2.028 indivíduos e amostras de sangue de 345 indivíduos, sendo 165 indivíduos positivos para infecção por de acordo com a microscopia. O ELISA para detecção de IgM obteve uma sensibilidade de 45% e a detecção de IgG de 72,12%. Foi observado interferência da idade apenas no grupo dos infectados ($p = 0,0011$). Não foi demonstrado relação entre carga parasitária e positividade no teste imunológico. O protocolo desenvolvido pode ser um candidato para utilização no diagnóstico de indivíduos de áreas endêmicas.

Palavras-chave: ELISA. Estudos soropidemiológicos. Testes imunológicos. Imunoglobulinas. Esquistossomose mansoni.

PEREIRA, Maria Eduarda da Silva. **Implantação de métodos de diagnóstico imunológico para a Esquistossomose mansônica baseado em ELISA para a detecção de Imunoglobulinas humanas**. 2022. 80. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

In Brazil, schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the species *Schistosoma mansoni*. The diagnosis of the disease is mainly based on the Kato-Katz parasitological method, however, the technique has reduced sensitivity in places of low endemicity. Knowing this, alternative diagnostic methods are needed for sensitive detection of infected individuals. Thus, the aim of the study was to develop diagnostic methods for Schistosomiasis mansoni based on antibody detection. The production of soluble adult worm antigens (SWAP), standardization of the enzyme immunosorbent method (ELISA) for detection of specific IgM and IgG against SWAP, an epidemiological survey with individuals from an endemic area to validate the ELISA test and correlation of immunoglobulin levels with the parasite load, sex and age of individuals. In the statistical analysis, the Chi-square test and the non-parametric Mann-Whitney t test were used. An antigenic concentrate of 440 µg/mL was obtained for use in the reactions. During standardization, the best conditions were obtained using antigen concentrations of 10 µg/mL and 1:1,000 conjugate dilution. In the survey, stool samples were collected from 2,028 individuals and blood samples from 345 individuals, 165 of which were positive for infection by microscopy. The ELISA for the detection of IgM obtained a sensitivity of 45% and the detection of IgG of 72.12%. Age interference was observed only in the infected group ($p = 0.0011$). There was no relationship between parasite load and positivity in the immunological test. The protocol developed may be a candidate for use in the diagnosis of individuals from endemic areas.

Key words: ELISA. Seroprevalence. Immunodiagnosis. Immunoglobulins. Mansonic schistosomiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição mundial das espécies causadoras.	13
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	16
Figura 3 – Mapa mundial da prevalência da esquistossomose, 2012	17
Figura 4 – Taxas de positividade para esquistossomose acordo com o INPEG 2010/2015	18
Figura 5 – Indução de respostas de células T auxiliares 1 e 2 e desenvolvimento de células T reguladoras após infecção com <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 6 – Células envolvidas na formação do granuloma ao redor do ovo	24
Figura 7 – Realização do ELISA no Laboratório de Referência em Esquistossomose.	41
Figura 8 – Esquema das etapas do ELISA.	41
Figura 9 – Eletroforese dos antígenos de cercária (1), ovos (2), vermes adultos macho (3) e fêmea (4 e 5).	44
Figura 10 – Comparação dos níveis de IgM e IgG entre indivíduos infectados por <i>S. mansoni</i> e não infectados.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do parasitológico de fezes dos animais infectados pelo método de Kato-Katz. 43

Tabela 2 – Comparação dos níveis de anticorpos IgM total anti-SWAP nos grupos de pacientes infectados por *S. mansoni* e o grupo dos não infectados e avaliação do Odds Ratio (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%), sensibilidade, especificidade e valor de p, obtidos nas leituras de 450 nm e 494 nm. 47

Tabela 3 – Comparação dos níveis de anticorpos IgG total anti-SWAP nos grupos de pacientes infectados por *S. mansoni* e o grupo dos não infectados e avaliação do Odds Ratio (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%), sensibilidade, especificidade e valor de p, obtidos nas leituras de 450 nm e 494 nm. 48

Tabela 4 – Correlação entre os indivíduos positivos para o IgG Anti-SWAP e o sexo, idade e carga parasitária de infectados através de análise univariada pelo Chi-quadrado na leitura de 492 nm. 49

Tabela 5 – Tabela 5: Correlação entre os indivíduos positivos para o IgG Anti-SWAP e o sexo e idade de não infectados através de análise univariada pelo Chi-quadrado na leitura de 492 nm. 50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	FASES DO PARASITA	14
1.2	CICLO DE VIDA	
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	16
2.2	PATOGÊNESE	20
2.3	IMUNOLOGIA DA DOENÇA	22
2.4	DIAGNÓSTICO	25
2.4.1	Diagnóstico clínico	25
2.4.2	Diagnóstico parasitológico	26
2.4.3	Diagnóstico molecular	27
2.4.4	Diagnóstico imunológico	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	DESENHO DO ESTUDO	37
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
4.3	ÁREA DE ESTUDO E LOCALIDADES	37
4.4	METODOLOGIA DO OBJETIVO 1: INFECTAR CAMUNDONGOS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO <i>S. MANSONI</i> E PARA OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS	38
4.5	METODOLOGIA DO OBJETIVO 2: PRODUZIR ANTÍGENOS SOLÚVEIS A PARTIR DOS VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i> PARA DETECTAR IMUNOGLOBULINAS EM SORO DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	39
4.6	METODOLOGIA DO OBJETIVO 3: PADRONIZAR O MÉTODO DE “ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY” (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgM E IgG ESPECÍFICAS PARA ANTÍGENOS DE VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i>	40

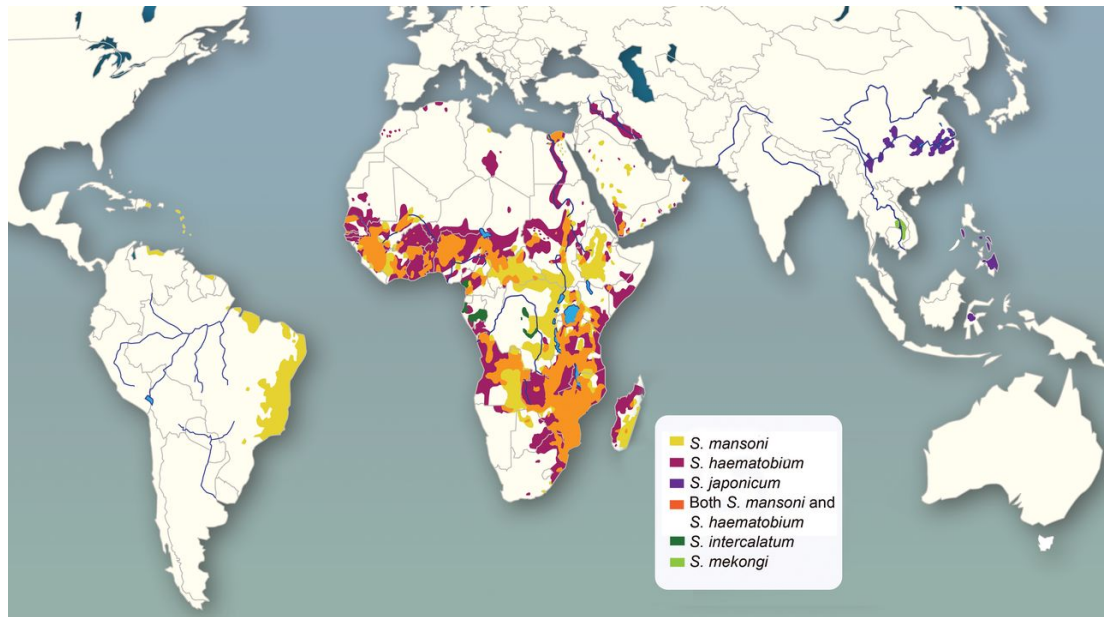
4.7	METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO 4: REALIZAR INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO (MÉTODO DE KATO-KATZ) PARA VALIDAR O TESTE DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA	41
4.8	METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO 5: CORRELACIONAR OS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINA A CARGA PARASITÁRIA, SEXO E IDADE DOS INDIVÍDUOS	42
5	RESULTADOS	43
5.1	INFECTAR CAMUNDONGOS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO <i>S. MANSONI</i> E PARA OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS	43
5.2	PRODUZIR ANTÍGENOS SOLÚVEIS A PARTIR DOS VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i> PARA DETECTAR IMUNOGLOBULINAS EM SORO DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	45
5.3	PADRONIZAR O MÉTODO DE “ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY” (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgM E IgG ESPECÍFICAS PARA ANTÍGENOS DE VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i>	44
5.4	REALIZAR INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO (MÉTODO DE KATO-KATZ) PARA VALIDAR O TESTE DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA	44
5.5	CORRELACIONAR OS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINA A CARGA PARASITÁRIA, SEXO E IDADE DOS INDIVÍDUOS	49
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXOS	77
	ANEXO A – Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da IAM	78
	ANEXO B – Cópia do parecer do Comitê de Ética em Experimentação animal (CEUA)	79

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária de veiculação hídrica, causada por vermes trematódeo do gênero *Schistosoma* (WHO, 1998). A doença afeta a humanidade desde o Egito antigo, de onde foram recuperados ovos em múmias a partir de estudos realizados milhares de anos depois (NUNN; TAPP, 2000). Os primeiros estudos descrevem a esquistossomose em meados do século XIX como a síndrome aguda da Katayama (FUJI, 1847). Ademais, a doença já foi descrita como Bilharziose, sendo conhecida popularmente no Brasil como xistosa, mal do caramujo ou barriga d'água.

As espécies causadoras da esquistossomose são distribuídas ao redor do mundo: *Schistosoma japonicum*, causando a esquistossomose japônica intestinal na China, Japão, Indonésia, Filipinas e Tailândia; *Schistosoma haematobium*, causando esquistossomose hematóbica, vesical ou urinária na África e Península Arábica; *Schistosoma mansoni*, única espécie causadora da esquistossomose intestinal no Brasil e, também, responsável pela doença em outros países da América Latina; *Schistosoma intercalatum*, causador de esquistossomose intestinal, em países da África Central; *Schistosoma mekongi*, causando também esquistossomose intestinal no Sudoeste Asiático; *Schistosoma bovis*, *Schistosoma mattheei*, *Schistosoma rodhaini*, causadores de esquistossomose ocasionalmente no hospedeiro homem no continente africano mas causam principalmente a doença em animais (KATZ; ALMEIDA, 2003). Na figura 1 é apresentado a distribuição das espécies causadoras da doença mundialmente.

Figura 1: Distribuição mundial das espécies causadoras.



Fonte: WEERAKOON et al.2015

As espécies de hospedeiros intermediários naturais envolvidos no ciclo do parasita são caramujos específicos para cada espécie de parasita. Moluscos do gênero *Bulinus* são os hospedeiros intermediários das espécies *S. haematobium*, *S. intercalatum* e *S. guineensis*; *Oncomelania* do *S. japonicum*, e *Neotricula aperta* para *S. mekongi* (COLEY, 2014). Para *S. mansoni*, os hospedeiros são da família Planorbidae, em que apenas o gênero *Biomphalaria* apresenta destaque, apresentando três espécies principais: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); *Biomphalaria tenagophila* (D'orbigny, 1835); *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Outras três espécies, *B. peregrina* (D'orbigny, 1835), *B. amazonica* (Paraense, 1966) e *B. cousini* (Paraense, 1966) já foram infectadas experimentalmente e por isso são consideradas hospedeiras em potencial deste trematódeo.

1.1 FASES DO PARASITA

O parasita apresenta diferentes formas durante o ciclo de vida, o ovo, miracídio, cercária, vermes adultos machos e fêmeas.

Ovo: tem cerca de 150 micrômetros e formato oval, com um espículo voltado para trás e geralmente essa forma é encontrada nas fezes de indivíduos infectados. Essa morfologia varia para as diferentes espécies. No ovo maduro, possui um miracídio formado (REY, 2001).

Miracídio: Apresenta forma cilíndrica, cílios implantados na células epidérmicas (para permitir seu movimento), papila apical ou *terebratorium*, glândulas adesivas, um tubo digestivo e sistema nervoso primitivos e aparelho excretor (REY, 2001).

Cercária: apresentam cauda bifurcada, duas ventosas, glândulas de penetração, intestino primitivo e células flama compondo o seu sistema excretor (REY, 2001).

Macho: mede cerca de 1 cm, cor esbranquiçada e tegumento recoberto por tubérculos. Na sua porção anterior, tem a ventosa oral e a ventral; na posterior, o canal ginecóforo, onde as fêmeas são albergadas para fecundação. Possui o esôfago, que se bifurca próximo ao nível da ventosa ventral e depois se funde formando o ceco (REY, 2001).

Fêmea: um pouco maior que o macho, cerca de 1,5 cm, e mais escura devido ao sangue semidigerido. Na metade anterior, possui ventosa oral e ventral, em seguida partes do sistema reprodutor (REY, 2001).

1.2 CICLO DE VIDA

O trabalho foi focado na esquistossomose mansônica devido a presença apenas da espécie *S. mansoni* no Brasil, o ciclo de vida dessa espécie será descrito. O homem é o principal hospedeiro e o que melhor funciona como reservatório natural da infecção. O ciclo biológico para manutenção deste parasita da natureza se faz da seguinte forma: Os ovos do *S. mansoni* são eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo infectado (homem). Na água, eclodem, liberando uma larva ciliada denominada miracídio, a qual infecta o caramujo (COELHO, 2008).

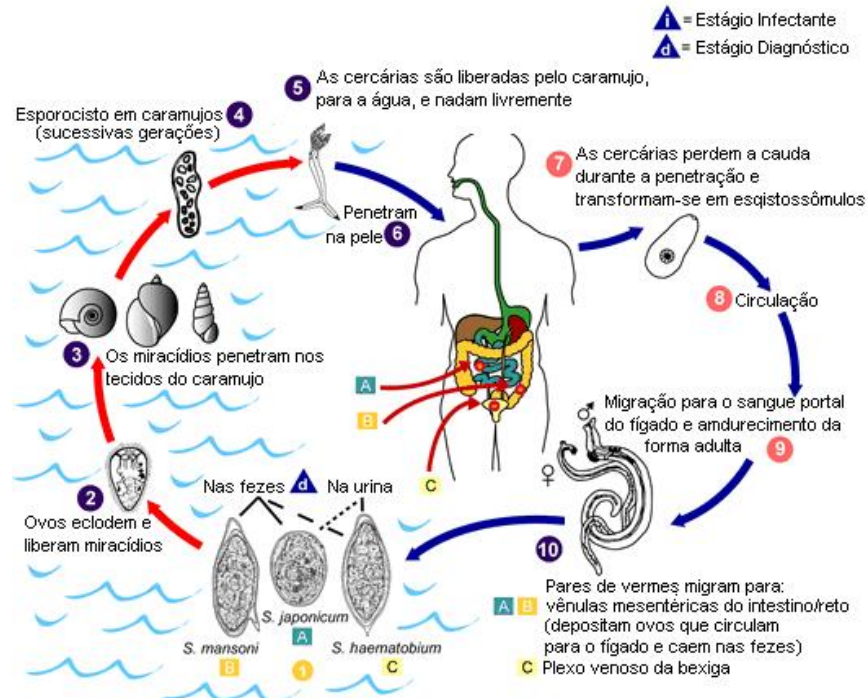
O hospedeiro intermediário (caramujo) exerce um papel fundamental na manutenção da parasitose. Das três espécies de moluscos que transmitem, em condições naturais, o parasita, a *B. glabrata* é a mais suscetível dos hospedeiros intermediários no Brasil, devido à sua distribuição e eficiência na transmissão da esquistossomose (MARCHIORI, 1999). Além da presença de moluscos suscetíveis à infecção por espécies de *Schistosoma*, é necessário o contato da população com essas águas contaminadas para que o ciclo seja completado. O contato da comunidade local com essas águas se dá pela necessidade da realização de atividades diárias, como lavagem de roupas e banhos, ou até mesmo por lazer.

Ao penetrar ativamente pelas partes moles do caramujo, habitantes naturais de coleções hídricas de água doce, o miracídio perde seu revestimento epitelial ciliado e se transforma numa estrutura sacular, denominada esporocisto primário, que cresce e, após 72 horas, dobra de tamanho. Por volta do 14º dia após a penetração miracidiana, ele se transforma em esporocistos secundários. Esses migram para a glândula digestiva do caramujo, onde darão origem às cercárias (REY, 2001).

Após 4 a 6 semanas, abandonam o caramujo, na forma larval infectante denominada de cercária, ficando livres nas águas naturais. O contato humano com águas infestadas pelas cercárias é a maneira pela qual o indivíduo adquire a esquistossomose. As cercárias saem do molusco para a água por volta da quinta semana, estimuladas pela luz ambiente, através da formação de vesículas no epitélio do caramujo. Elas nadam no meio líquido e podem entrar em contato com a pele do hospedeiro definitivo (homem ou outro animal suscetível), onde se fixam graças à existência de glândulas de adesão e, por meio de movimentos rotatórios, penetram ativamente na pele do hospedeiro. Assim que penetra, o corpo cercariano transforma-se em esquistossômulo, organismo vermiforme. Esse penetra em um vaso cutâneo e é passivamente arrastado pela circulação em direção ao coração e aos pulmões. Após oito dias da penetração das cercárias, os esquistossômulos começam a chegar ao fígado. Através da circulação, estes chegam ao sistema porta intra-hepático, onde amadurecem, alcançando a fase adulta (REY, 2001).

Na quarta semana, os vermes adultos se acasalam, onde a fêmea aloja-se no canal ginecóforo do macho, em seguida, começam o processo de migração para o plexo hemorroidário superior e para a veia mesentérica inferior, onde a fêmea põe seus ovos, um de cada vez. Ovos isolados ou fiadas numerosas podem obstruir a luz dos capilares. O desenvolvimento embrionário é ainda incompleto, no momento da oviposição, requerendo cerca de 7 dias para completar-se. Esses ovos imaturos lançados pelas fêmeas na luz dos capilares da mucosa efetuam um percurso até a cavidade intestinal. Nesse local, os ovos são expulsos com as fezes. Quando as fezes são lançadas na água, ou quando os ovos são arrastados para dentro da água pelas chuvas que lavam os terrenos contaminados, a eclosão dá-se rapidamente, dando início a um novo ciclo de desenvolvimento em outros hospedeiros (REY, 2001). O ciclo se encontra resumido na Figura 2.

Figura 2: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. No esquema, é evidenciada a fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*), e a fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro definitivo.



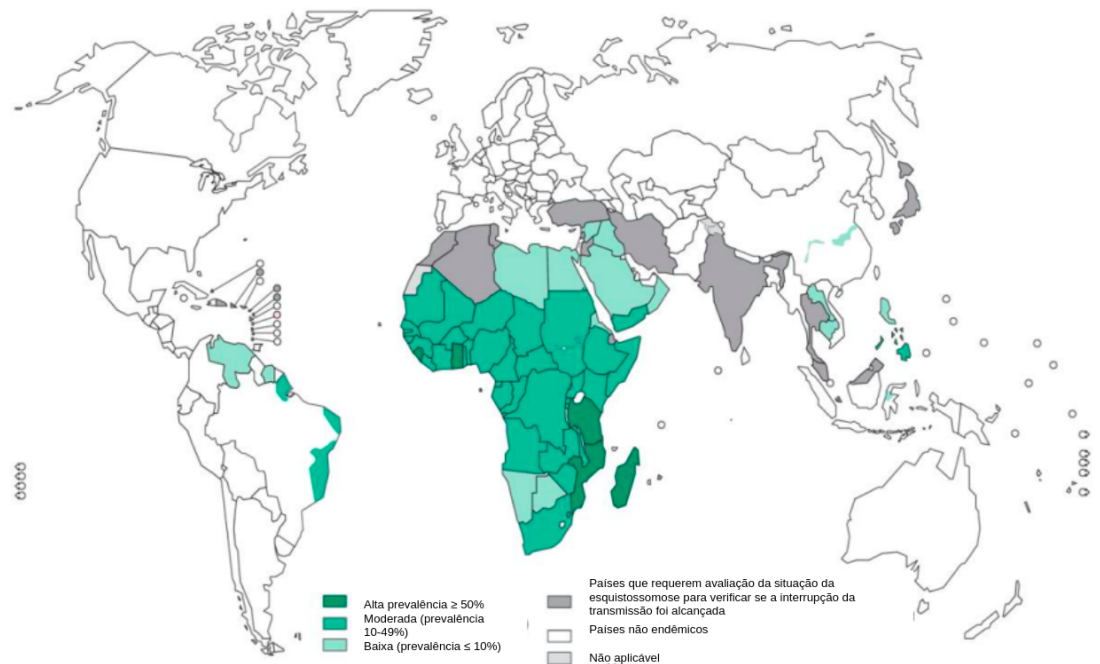
Fonte: Adaptado de CDC. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.html>>.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A esquistossomose ainda se apresenta como uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo endêmica em 78 países e territórios e apresentando estimativa de mais de 200 milhões de pessoas infectadas e mais de 700 milhões em risco (WHO, 2016), é possível visualizar na Figura 4 a distribuição mundial da doença. A doença é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, presente, principalmente, em comunidades pobres, onde não há saneamento adequado ou distribuição de água potável à população (WHO, 2012). A doença apresenta-se como a segunda doença parasitária com maior impacto socioeconômico, estimando uma perda anual de 4,5 milhões de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs) (WHO, 2002).

Figura 3: Mapa mundial da prevalência da esquistossomose, 2012.



Fonte: WHO (2012). Disponível em

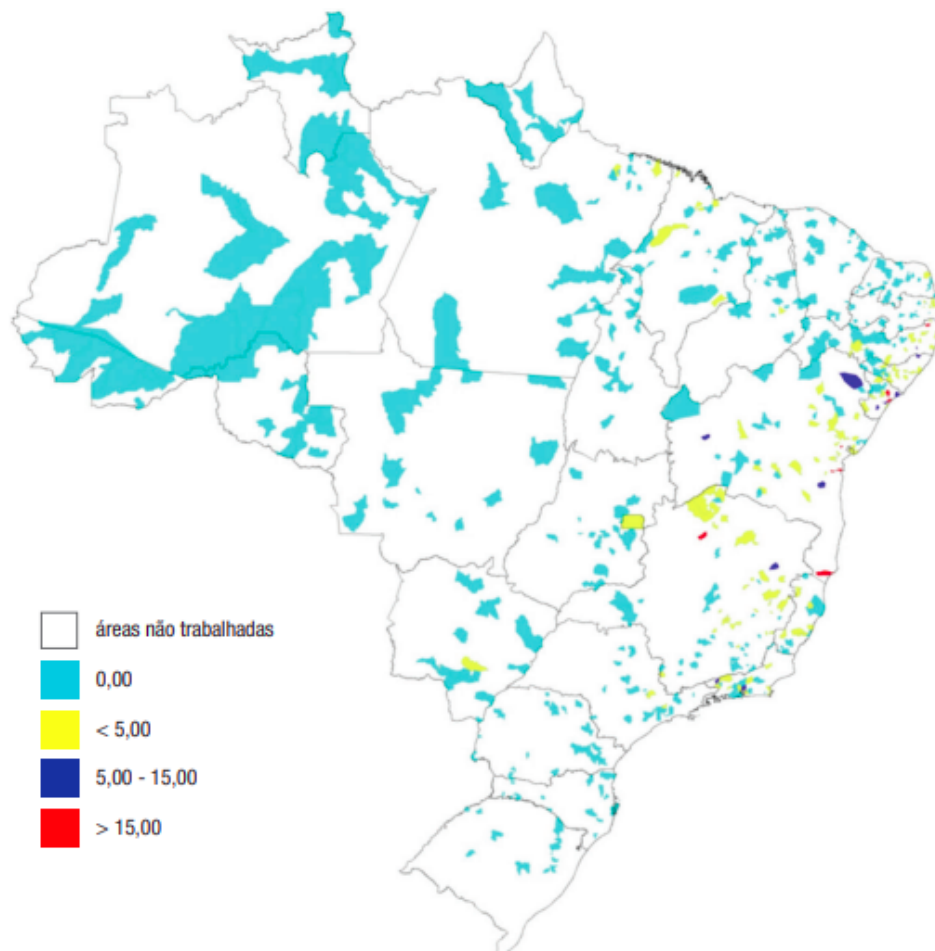
<https://www.who.int/schistosomiasis/Schistosomiasis_2012-01.png?ua=1>. Acesso em 4 de fevereiro de 2022 .

Na América, a esquistossomose é endêmica em Suriname, Venezuela, República Dominicana, Guadalupe, Santa Lucia e no Brasil (NOYA, 2015). Na América Latina e territórios Caribenhos, é estimado 1,8 milhões de pessoas infectadas e 36 milhões em risco (HOTEZ, 2008).

No Brasil, acredita-se que o estabelecimento da doença se deu devido a migração de escravos africanos pela Colônia Portuguesa infectados, que possibilitaram o início de focos de transmissão no país, o que foi possível devido às condições sanitárias no país, intrínsecas ao ciclo do parasita e aos hospedeiros intermediários (MORGAN *et al*, 2001; KATZ, 1992), porém, existem evidências dessa endemia muito antes dessa época. Esses escravos se encontravam infectados por duas espécies, *Schistosoma mansoni* e *S. haematobium*, porém, a segunda não conseguiu continuar na América Latina devido a ausência do seu hospedeiro intermediário. A região Nordeste e o estado de Minas Gerais foram as primeiras áreas endêmicas no Brasil para esquistossomose mansônica. A partir daí, a doença se espalhou e começaram a surgir focos no Sudeste e em áreas do Norte (KATZ; ALMEIDA; 2003). Há uma estimativa de 1,5 milhões de pessoas infectadas e

mais de 49 milhões de pessoas em risco no país (BRASIL, 2014). A prevalência da esquistossomose, segundo o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses (INPEG), realizado no período de 2010 a 2015, foi de 0,99% (KATZ, 2018). A doença está presente em 19 Unidades Federativas (BRASIL, 2014), sendo endêmica em oito. As regiões Nordeste e Sudeste apresentam os maiores índices de positividade. Na região Nordeste, o estado de Pernambuco ocupa o terceiro com maiores números de positivos, atrás de Sergipe e Bahia (KATZ, 2018). É possível visualizar na Figura 3 a distribuição da doença no Brasil de acordo com o último inquérito realizado.

Figura 4: Taxas de positividade para esquistossomose acordo com o INPEG 2010/2015.



Fonte: Katz. INPEG (2018). Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sinan/inpeg/RelatorioINPEG.pdf>. Acesso em 4 de fevereiro de 2022.

Em Pernambuco, 93 de 185 municípios são endêmicos para esquistossomose (SILVA; DOMINGUES, 2011) e na região da Zona da Mata, a esquistossomose se encontra presente em todos os 43 municípios e três microrregiões (BARBOSA, 2006). No Estado de Pernambuco, a esquistossomose é historicamente endêmica na região rural (BARBOSA, 2010). Focos desta doença estão surgindo em áreas indenes do litoral do Estado e casos humanos de infecção aguda têm sido detectados em praias onde a doença foi introduzida. Trabalhadores rurais desempregados e infectados pelo parasito estão migrando para os pólos de desenvolvimento turístico do Estado, passando a residir em áreas com condições sanitárias precárias marginalizadas na periferia das praias. Assim, acabam por contaminar as coleções hídricas disponíveis, habitadas pelos moluscos vetores. Dessa forma, novos focos de esquistossomose são criados e são encontrados na região litorânea do Estado e novos sítios de transmissão ativa da doença têm sido detectados em localidades praianas com alta presença de turismo e veraneio de classe média alta (BARBOSA *et al.*, 1996, 1998, 2000).

Como consequência, vem se notando uma mudança no perfil epidemiológico desta endemia em Pernambuco. Em áreas rurais, a esquistossomose se apresenta predominantemente sob a forma crônica, incidindo na classe social de baixa renda e, no litoral, a doença é representada por casos agudos em pessoas de classe média e alta. Além disso, nas áreas rurais, há maior prevalência do vetor o *Biomphalaria straminea*. No litoral, a doença tem principalmente como vetor o *B. glabrata* (BARBOSA *et al.*, 2001; BARBOSA, 2000).

Além disso, vem ocorrendo mudanças de áreas de risco em localidades endêmicas, como exemplo, nas diferentes regiões de Porto de Galinhas, localizada no município de Ipojuca. A região de Merepe III apresentava maior risco da doença em 2000 e dez anos depois, a região de Salina que ocupava essa posição. Alguns dos fatores que explicam essa mudança foram as melhorias sanitárias feitas em Merepe III e a expulsão dos moradores para áreas de periferias sem condições sanitárias adequadas e afastadas as áreas de turismo litorâneo em Porto de Galinhas (GOMES, 2012). Além disso, a presença de fontes de transmissão peridomiciliares em áreas urbanas de municípios que circundam a Zona da Mata de Pernambuco agravam a situação epidemiológica, levando a doença para localidades urbanas onde não estava presente (GOMES, 2016).

Um estudo de acompanhamento realizado em Porto de Galinhas, publicado em 2022, apresentou que a prevalência da doença vem sendo reduzida em torno de 50%, quando comparados aos estudos realizados em 2000, 2010 e 2020. Além disso, Salinas se manteve como a região de maior importância na transmissão da doença. Esses estudos publicados revelam um reflexo do processo da urbanização ocorrido, onde Merepe III era a localidade mais significativa para transmissão no primeiro estudo, cenário que foi alterado após os processos de melhoria na condição sanitária da área. Enquanto em Salinas ocorreu o contrário, como consequência da falta de estrutura em uma área marginalizada de Porto de Galinhas (GOMES, 2022).

Um estudo conduziu um estudo utilizando modelo espaço temporal, analisando as mortes ocorridas entre 1999 e 2018, relacionadas à esquistossomose e observou que a maior porcentagem de mortes (65,81%) ocorreram no Nordeste e o estado de Pernambuco apresentou relevância para esses números. Além disso, destacou que a doença ainda tem um impacto relevante, principalmente em regiões pobres (SILVA DA PAZ *et al*, 2021), isso corrobora para a necessidade de melhorias nos programas de controles, pois estes podem agir de forma mais segura nas suas estratégias, utilizando métodos sensíveis para identificar corretamente indivíduos infectados e conseguir estimar a real prevalência na população e, com isso, definir localidades para atuação.

2.2 PATOGÊNESE

A esquistossomose pode apresentar sintomatologia variada, que é dependente tanto de fatores intrínsecos ao paciente, tais como estado nutricional, idade e a imunidade, quanto de fatores intrínsecos ao parasita, como a linhagem infectante e a carga parasitária (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Na fase inicial, a doença pode ser assintomática ou apresentar sintomas. A primeira apresentação inicia-se após o contato com a forma infectante do parasita, em que o indivíduo irá apresentar manifestações na pele conhecidas como “dermatite cercariana”, uma resposta inflamatória frente a reação contra cercárias que não conseguem penetrar a pele do hospedeiro. Essa reação acontece principalmente no primeiro contato com o parasita, como em crianças ou viajantes visitantes de áreas endêmicas (ROSS, 2007). As manifestações da forma aguda da doença ocorrem aproximadamente em três a quatro semanas após a infecção acontecer com sucesso, devido a reação de hipersensibilidade aos antígenos

liberados pelo parasita. Os sintomas podem ser linfadenopatia, mal-estar, febre, hiporexia, tosse seca (devido a presença dos esquistossômulos que passaram pelo pulmão), sudorese, dores musculares, dor na região do fígado ou do intestino, diarreia, cefaleia e prostração, entre outros podem ser apresentados (REY, 2008). Com o início da ovipostura, os sintomas se intensificam, podendo ocorrer lesões no fígado e baço, também devido à hipersensibilidade e formação de imunocomplexos, agora em resposta à presença dos antígenos solúveis do ovo, as glicoproteínas conhecidas como SEA (ROSS, 2007). Como resposta protetora, formam-se granulomas caracterizados pela infiltração de eosinófilos e tecido conjuntivo ao redor dos ovos e estes são responsáveis pela fisiopatologia da doença na fase crônica ou tardia (GRYSEELS, 2012). As formas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica são as principais manifestações.

Forma intestinal: Está associada a presença de ovos presos na mucosa intestinal, o que resulta em microulcerações e sangramentos, os pacientes irão apresentar diarreia mucosanguinolenta, dor e tenesmo (GRYSEELS, 2006).

Forma hepatointestinal: A presença de ovos no tecido hepático leva ao desenvolvimento de granulomas ao seu redor em resposta aos antígenos liberados, causando deposição de fibras colágenas e eosinófilos. Essa resposta é progressiva, assim, ao decorrer dos anos, pode resultar em fibrose, a presença dessas fibras irá ocluir vasos hepáticos próximos. A progressão da doença pode resultar em fibrose periportal grave, conhecida como fibrose de Symmer, com deposição de colágeno ao redor da veia porta, oclusão dos ramos portais menores e patologia grave, muitas vezes irreversível. A presença de fibrose periportal pode causar hipertensão periportal e esplenomegalia nos pacientes, assim, nessa fase, é possível visualizar fígado aumentado, sólido e nodular a palpação (GRYSEELS, 2012).

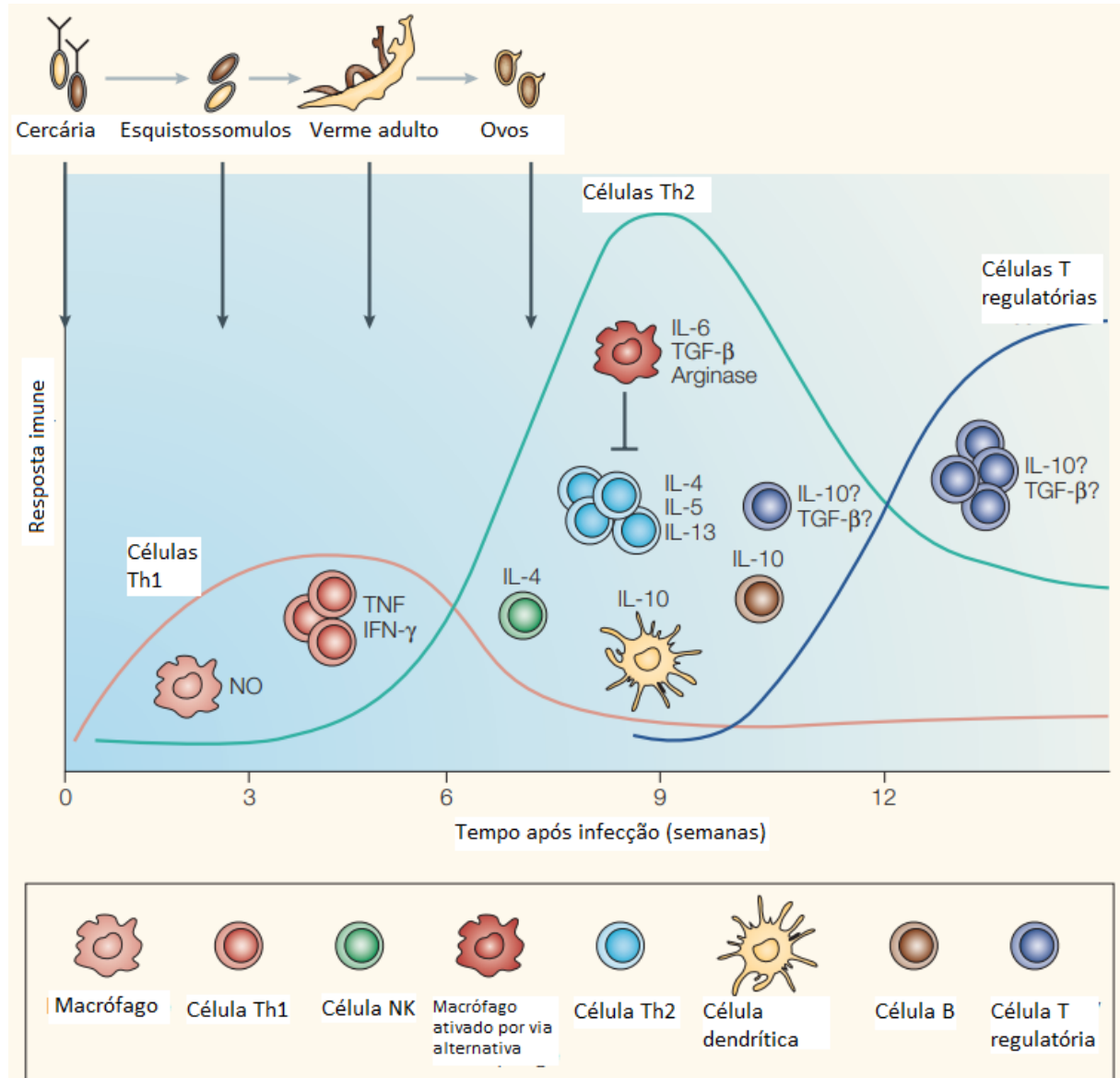
Forma hepatoesplênica: O baço também pode ser afetado devido à hipertensão portal, reações de hipersensibilidade e a presença de ovos presos no tecido. Dessa forma, seu tamanho também pode estar aumentado. As manifestações clínicas causadas pela forma hepatoesplênica podem causar complicações, como hipertensão periportal, circulação colateral, shunt porta-caval e varizes esofágicas. As varizes apresentam grande risco ao paciente pois seu rompimento pode resultar em sangramentos esofágicos e hemorragias, as quais podem ser causa de anemia e hipoalbuminemia, que pode ser uma das causas da ascite (GRYSEELS, 2012; TONELLI, 1972).

A presença de ovos do verme adulto fora do sistema porta cava do hospedeiro caracteriza as formas ectópicas da esquistossomose (NEVES; CUNHA, 1978). Entre elas, a mielorradiculopatia esquistossomótica (MRE) se caracteriza como a manifestação mais comum e grave, sendo definida pela presença de ovos de *Schistosoma* no sistema nervoso central (VIDAL, 2010). Ao redor dos ovos, irá ocorrer a formação da resposta imune granulomatosa, desencadeada também pelas glicoproteínas liberadas no local. A MRE se manifesta clinicamente com uma tríade composta por dor lombar, alteração da força e/ou sensibilidade dos membros inferiores e distúrbios urinários (BRASIL, 2006). Outras formas ectópicas já foram descritas na literatura, como a esquistossomose prostática, já descrita em Pernambuco pela primeira vez em 2016 (GOMES, 2016). Também existem registros da presença de ovos na pele (ANDRADE FILHO, 1998) e no sistema reprodutor feminino (LAMBERTUCCI, 2009).

2.3 IMUNOLOGIA DA DOENÇA

A resposta imunológica desencadeada pelo parasita se inicia a partir das 12 primeiras horas depois do contato com as cercárias. É possível observar um exantema maculopapular pruriginoso, no qual sua expressão pode ser mais intensa após exposições repetidas e são dependentes da duração de exposição e estado imune do indivíduo (AUGUSTINE; WELLER, 1949; CHARMOT; TOSCANI; ROUGEMONT, 1998). Essa resposta é composta por infiltrado de polimorfonucleares e mononucleares, células de Langerhans e citocinas como IL-1b, IL-6, IL-12p40, IL-10, demonstrando maior predominância da resposta Th1 (HOGG, 2003; KOURILOVA, 2004). Com a transformação dos esquistossômulos em vermes adultos, ocorre o início das manifestações de fase aguda (MAHMOUD, 2009). Na fase aguda, ocorre principalmente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF), o que representa a predominância a resposta de linfócitos CD4+ T helper do tipo (Th1). Acredita-se que esse perfil seja responsável pelas lesões teciduais e perfil clínico dessa fase (SOUZA, 2011). A figura 5 mostra um resumo da dinâmica que ocorre durante a infecção por *Schistosoma* e as principais interleucinas envolvidas.

Figura 5: Indução de respostas de células T auxiliares 1 e 2 e desenvolvimento de células T reguladoras após infecção com *Schistosoma mansoni*.

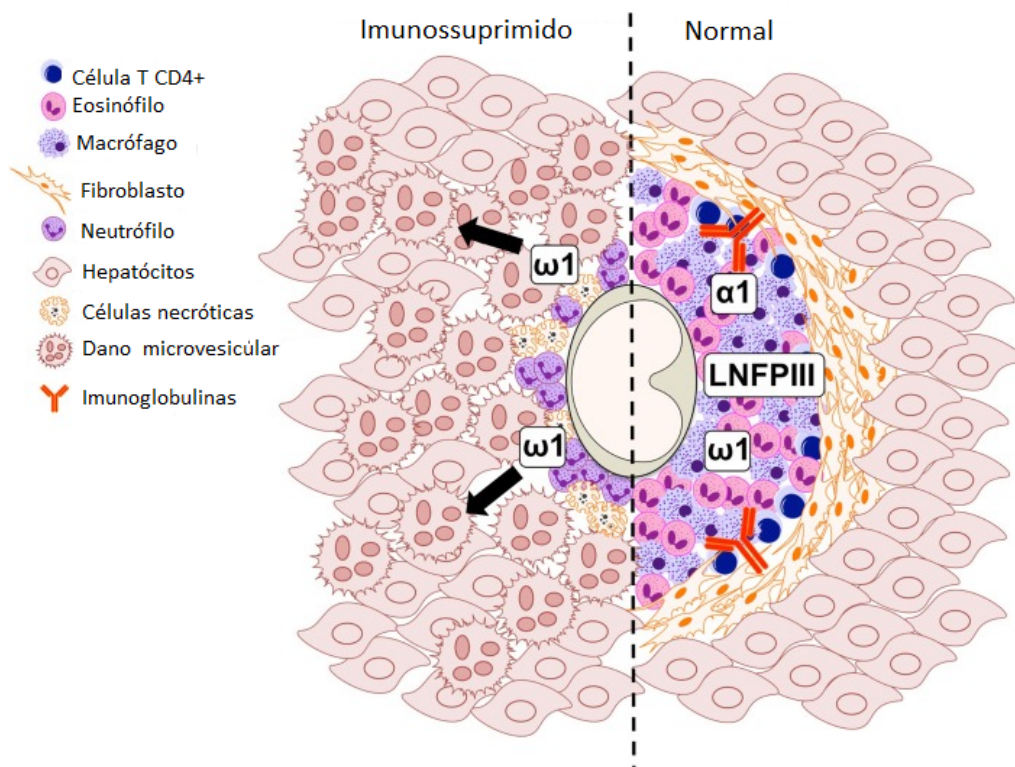


Fonte: Dunne DW, Cooke A.(2005).

O início da ovipostura induz a transição da resposta imunológica para o tipo 2 (Th2), devido a liberação dos antígenos solúveis dos ovos, as células dendríticas produzem mais interleucina-10 (IL-10) e menos IL-12. As células T CD4+ que se diferenciam em células Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN-γ. A IL-4 (e a IL-13) atuam nas células B para estimular a produção de anticorpos, principalmente IgE, por se tratar de uma resposta a helmintos, e essa

imunoglobulina se liga aos mastócitos. A IL-5 ativa os eosinófilos, célula importante para a defesa contra infecções por helmintos. Após o início da ovipostura, a resposta Th1 e as citocinas associadas a elas são infra-reguladas/inibidas e a IL-10 tem papel crucial nesse processo (SHER *et al*, 1991). Toda essa resposta em conjunto resulta no desenvolvimento dos granulomas ao redor dos ovos, que agem como uma resposta crônica protetora, além de ser responsável pelas manifestações clínicas da fase crônica (EVERTS, 2012; MONTENEGRO, 1999). O granuloma é formado por eosinófilos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células dendríticas e outros. A figura 6 traz uma representação das células envolvidas na formação do granuloma em imunossuprimidos (direita) e indivíduos normais.

Figura 6: Células envolvidas na formação do granuloma ao redor do ovo.



Fonte: HAMS; AVIELLO; FALLON (2013).

Além das funções mencionadas, a IL-4 e a IL-13 induzem a ativação dos macrófagos pela via alternativa. Os macrófagos podem ser ativados pela via clássica (M1) ou alternativa (M2). A via M1 é estimulada por citocinas inflamatórias como IFN- γ , IL-12, TNF ou IL-1 β (perfil Th1). Já a via M2 é induzida por citocinas

características do perfil Th2, como IL-4 e IL-13, relacionada à expressão de arginase-1 (Arg-1), Ym-1 e Fizzl (GORDON, 2003). O perfil Th2 induzido após a ovipostura aumenta a presença de macrófagos alternativamente ativados nos granulomas (HESSE, 2000). Como consequência dos granulomas, ocorre o desenvolvimento da fibrose hepática periportal, um dos eventos patogênicos mais importantes da esquistossomose (CARVALHO, 2008). A IL-13 é a principal citocina envolvida no desenvolvimento da fibrose hepática na esquistossomose (JESUS, 2004; CHIARAMONTE, 2001), sendo o principal processo fisiopatológico causador das complicações de fase crônica, como hipertensão periportal e varizes esofágicas, que estão associadas à casos graves e ao desfecho de morte (DOMINGUES; FERRAZ, 2012).

Embora seja parcialmente prejudicial, a formação do granuloma é uma resposta protetora, pois as glicoproteínas liberadas pelos ovos são tóxicas para os hepatócitos (DAMIAN, 1984) e sem a indução da resposta Th2, o perfil do tipo 1 seria predominante e isso manteria a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que induziriam maior dano ao tecido (PATTON, 2002). O primeiro estudo que destacou que a resposta Th2 é essencial para sobrevivência do hospedeiro foi publicado em 1997, em que experimentos mostraram que a incapacidade de induzir uma resposta do tipo Th2 e, conseqüentemente, a não inibição da resposta Th1, estaria associada com a morte em animais infectados (BRUNET, 1997). Além disso, a polarização extrema das duas respostas pode ser prejudicial para o hospedeiro, indicando a importância da regulação da resposta Th e a participação das citocinas IL-10 e IL-4 mostraram ter papel central nesse aspecto, impedindo respostas Th1 ou Th2 excessivas (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000).

2.4 DIAGNÓSTICO

2.4.1 Diagnóstico clínico

No diagnóstico clínico da esquistossomose, deve ser realizada uma anamnese minuciosa e avaliação das apresentações físicas que a doença pode causar. Inicialmente, é necessário ter acesso ao histórico médico do paciente, obter informações epidemiológicas sobre viagens a áreas endêmicas e contato com águas, para que o diagnóstico possa ser direcionado.

Durante a avaliação física, nas fases iniciais, é possível observar manifestações dermatológicas na forma de erupções na pele, chamadas de

“dermatite cercariana” e sintomas inespecíficos como, linfadenopatia, mal-estar, febre, hiporexia, tosse seca, sudorese, dores musculares, dor na região do fígado ou do intestino, diarreia, cefaleia e outros. É importante estar atento à presença de fígado ou baço palpáveis, uma vez que as formas tardias da doença podem causar hepatoesplenomegalia (BRASIL, 2014).

2.4.2 Diagnóstico parasitológico

Para confirmar a infecção, é necessário a realização de exames laboratoriais. No diagnóstico da esquistossomose, os métodos parasitológicos são os mais utilizados, sendo a técnica Kato-Katz (KK) considerada pela OMS o padrão ouro (WHO, 2012), que apresenta metodologia rápida, simples e acessível, mesmo para localidade pobres e, por isso, é amplamente utilizada no diagnóstico da doença. A técnica se baseia na detecção direta dos ovos presente nas fezes de indivíduos infectados (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972).

Em resumo, as fezes frescas são pressionadas e filtradas através de uma malha fina de 60 a 105 µm e postas em uma placa de plástico padronizada para transferir 41,7 mg de fezes em uma lâmina de microscópio. Em seguida, é coberta com estrutura plástica embebida em verde malaquita e espalhada uniformemente. Após a confecção, é necessário um intervalo ideal para que a preparação possa estar seca. A leitura é realizada ao microscópio, onde são contados o número de ovos visualizados no esfregaço espesso. O resultado é expresso pela multiplicação do número de ovos contados por um fator de 24, assim, é possível obter o valor de ovos estimado por gramas de fezes (OPG) (UTZINGER, 2015). Além dos ovos de *Schistosoma*, também é possível visualizar a presença simultânea de ovos de outros helmintos transmitidos pelo solo. A partir do resultado obtido pelo KK, é possível determinar a intensidade da infecção como leve (abaixo de 100 OPG), moderada (entre 100 e 399 OPG) ou grave (igual ou acima de 400 OPG).

Embora eficiente e específica em áreas de alta prevalência, a sensibilidade da técnica diminui em localidades onde a população apresenta baixa carga parasitária. Essa característica pode estar resultando em uma subnotificação da doença no país, visto que o KK é a técnica mais utilizada, mas que em indivíduos com baixa intensidade de infecção e excreção de ovos, resultados falsos negativos podem estar sendo liberados (ENK, 2008). Além disso, é difícil avaliar o impacto e eficácia da quimioterapia em massa e outras medidas de controle aplicadas, devido

a queda da sensibilidade dos métodos parasitológicos em locais onde os infectados possuem baixa eliminação de ovos, o que ocorre principalmente em locais de baixa endemicidade (IGREJA *et al.*, 2007; ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2007), áreas com prevalência < 10% e indivíduos com baixa intensidade de infecção (< 100 ovos por grama de fezes).

Como alternativa, estudos vêm avaliando a realização da leitura de múltiplas lâminas e a realização desses esfregaços utilizando amostras de fezes coletadas em dias e suas consequências na sensibilidade do KK. É visto que a sensibilidade da técnica aumenta quando aumenta o número de lâminas e amostras analisadas (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Além da análise de múltiplas lâminas, a associação a outros testes parasitológicos também é uma abordagem que revelou aumento na sensibilidade. A associação de 18 lâminas do KK e o TF-Test®, técnica parasitológica que permite a utilização de maior amostragem, substância preservante e dupla filtragem por centrifugação, juntas foram considerados como o “padrão ouro” em um estudo e identificou 72 (35,8%) dos 201 participantes como infectados. Quando considerando apenas 1 lâmina de KK, apenas 8% dos participantes foram identificados como positivos, mostrando que a utilização de uma técnica coprológica associada ao KK apresentou maior positividade do que apenas o KK sozinho (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Embora apresente resultados revelando aumento da sensibilidade, a aplicação no campo da leitura de múltiplas lâminas não parece ser viável ou prática. O tempo é um fator importante, visto que o KK padrão utilizando duas leituras requer 8 minutos para serem lidos e aumentando para 24 lâminas KK (1000 mg de fezes), aumentaria o custo e requer 90 minutos para analisar (SILVA-MORAES *et al.*, 2019). Entretanto, é necessário que esses indivíduos sejam identificados, pois eles continuarão a contribuir para a transmissão da doença e poderão estabelecer novas áreas de infecção, o que exigiria mais recursos financeiros. Por isso, é necessário abordagens para que esses indivíduos de áreas de baixa endemicidade sejam identificados e tratados. Para isso, uma outra alternativa é a utilização de testes moleculares e imunológicos no diagnóstico da esquistossomose.

2.4.3 Diagnóstico molecular

Uma outra alternativa para o diagnóstico da esquistossomose é a utilização de ferramentas moleculares para a detecção do DNA do parasita em amostras

biológicas. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é bastante utilizada em pesquisas realizadas principalmente em áreas de baixa endemicidade, e como técnica complementar com o intuito de aumentar a sensibilidade dos resultados obtidos. A técnica se baseia na amplificação do DNA do parasita. Em 2012, Pontes e colaboradores, a adaptaram para detecção do material genético de *S. mansoni* em amostras de fezes por PCR convencional (PONTES LA; DIAS-NETO E; RABELLO A., 2012).

Estudos vêm mostrando que a utilização da técnica de PCR convencional pode aumentar a identificação de indivíduos positivos utilizando amostras de fezes, obtendo alta sensibilidade (CARNEIRO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os autores concluíram que a PCR pode ser uma ferramenta de importância como teste adicional ou complementar aos testes sorológicos, sem que haja a necessidade de leitura de múltiplas lâminas parasitológicas.

Além da PCR convencional, a *Real-time* PCR também vem sendo utilizada como ferramenta de diagnóstico. A técnica pode trazer aumento da sensibilidade quando em comparação a microscopia (GUENGAN *et al.*, 2019) e isso também foi visto em áreas de baixa endemicidade (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2014). Ambos estudos mostram a capacidade de se obter altos valores de sensibilidade utilizando técnicas a Real Time PCR, sugerindo que a detecção molecular parece ser mais confiável do que a análise microscópica, principalmente em casos de infecções de baixa carga parasitária. E que se faz necessário o desenvolvimento de estratégias para erradicação da esquistossomose, em que o diagnóstico molecular pode ser uma alternativa para identificação confiável de indivíduos infectados (GUENGAN, 2019; ESPÍRITO-SANTO, 2014).

Pelo mesmo grupo que realizou a adaptação para diagnóstico molecular em amostra de fezes utilizando PCR, foi desenvolvido a técnica *PCR-enzyme-linked immunosorbent assay* (PCR-ELISA) em 2010. A técnica combina um método imunológico para quantificar o produto de PCR diretamente após a imobilização de DNA biotinilado em uma microplaca, cujo resultado é medido a partir da intensidade de cor produzida nas placas. Algumas vantagens em relação a PCR convencional são: maior facilidade comercial de obter materiais e reagentes que já são utilizados no ELISA, além disso, não é necessário realizar as etapas seguintes a amplificação, como eletroforese. Os primeiros resultados revelaram na análise de 206 pacientes de área endêmica: 30% de positividade utilizando a PCR-ELISA (500 mg de fezes),

enquanto a microscopia, utilizando 12 lâminas (41,7 mg/lâmina, 500 mg total), identificou apenas 18% (GOMES, 2010). Um estudo publicado em 2015 mostrou que entre 67 amostras de fezes analisadas, a microscopia utilizando duas 2 lâminas no KK detectou 16 positivos e a PCR-ELISA identificou 47, destacando a relevância das técnicas moleculares para a identificação de indivíduos que podem se apresentar como falsos negativos na microscopia (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos em estudos que avaliam o uso da PCR como técnica molecular de escolha para o diagnóstico da esquistossomose mostram alta sensibilidade, tendo assim, melhor performance na identificação de casos positivos, principalmente, em localidades de baixa endemicidade, como foi mencionado nos estudos anteriores. Entretanto, a técnica apresenta algumas desvantagens, como alto custo para realização dos ensaios devido a necessidade de reagentes, equipamentos sofisticados e pessoal treinado adequadamente para realização dos testes. Assim, se torna difícil seu uso principalmente levando em consideração que a esquistossomose é uma doença que afeta principalmente países em desenvolvimento e localidades com poucos recursos. Além disso, o seu uso no campo se torna dificultado devido a necessidade de refrigeração dos reagentes, necessidade de cabines de fluxo para impedir contaminação, uso de termocicladores e no caso da PCR convencional uma etapa de revelação se faz necessária após a amplificação do DNA. Levando em consideração as limitações da aplicação da técnica no campo, foi desenvolvida uma nova técnica molecular, com a proposta de ter alta sensibilidade mas não ter a necessidade de uso de termocicladores.

A técnica conhecida por LAMP (Loop-mediated isothermal amplification ou Reação isothermal medida por loop) (NOTOMI *et al.*, 2000) é capaz de funcionar em condições isotérmicas, em torno de 60-65 °C para a amplificação de DNA. Para desenvolver um ensaio LAMP para diagnóstico, é necessário o desenvolvimento/desenho de primers. São utilizados dois primers externos (F3 e B3), dois primers internos (*forward inner primer* (FIP) e *backward inner primer* (BIP)) e primers do loop forward e backward. Além disso, é necessário nucleotídeos e *Bst* DNA polimerase (NOTOMI, 2000; 2015).

Em comparação com técnicas moleculares, como a PCR, o LAMP utiliza apenas uma enzima e pode ser realizada em temperatura constante. As características da técnica e utilização do primer interno possibilita que a amplificação resulte em uma especificidade maior e seja mais eficiente. Além disso, é possível

utilizar métodos simples para detecção dos resultados a olho nu, como a turbidez ou fazer uso da fluorescência, o que é uma vantagem para sua utilização no campo (NOTOMI, 2015). Dessa forma, a técnica vem sendo aplicada para o diagnóstico de Doenças Tropicais Negligenciadas (MITASHI, 2013; PURI, 2021) e também para espécies de *Schistosoma* (ABBASI, 2010; GANDASEGUI, 2016; FERNÁNDEZ-SOTO, 2020).

A técnica SmMIT-LAMP, que foi desenvolvida anteriormente utilizando uma sequência de 620 bp de uma região minissatélite mitocondrial, foi avaliada em um estudo (GANDASEGUI, 2018). No trabalho, o objetivo principal foi avaliar a aplicação da técnica em condições de campo, com amostras de caramujos e fezes humanas de uma área endêmica. A técnica de KK identificou 13/427 (3,04%) dos indivíduos como positivos, enquanto o SmMIT-LAMP identificou um total de 49/162 (30,24%) como positivos, incluindo 12 dos 13 (92,31%) identificados como positivos pela técnica parasitológica, mostrando alta sensibilidade e melhor performance do que o KK. Na análise malacológica, foram coletados 1.175 caramujos da espécie *B. glabrata*, em que todos foram considerados negativos pela técnica de liberação de cercárias na exposição à luz. Para realização da técnica, essas amostras de caramujos foram agrupadas de acordo com sua localização. A técnica de Nested-PCR identificou um sítio como positivo, este mesmo sítio foi identificado como positivo pelo SmMIT-LAMP e mais um sítio adicional, onde ambos estavam localizados em áreas onde casos de indivíduos positivos foram encontrados. Dessa forma, foi observado que a técnica mostrou melhor eficiência em identificar positivos quando em comparação com o KK e ainda pode ser utilizada para auxiliar na identificação de focos e na vigilância ambiental (GANDASEGUI, 2018). As técnicas moleculares também podem auxiliar no monitoramento ambiental, detectando focos de caramujos infectados. A liberação de cercárias após exposição dos caramujos a uma fonte de luz é amplamente utilizada (FAVRE, 1995), porém, apresenta variáveis que podem se tornar limitações à sua aplicação. Para isso, é utilizado a PCR para identificar o DNA do parasita em amostras desses hospedeiros intermediários, onde no Brasil a Nested-PCR é amplamente utilizada no monitoramento de caramujos do gênero *Biomphalaria* e focos ativos de transmissão da esquistossomose (JANNOTTI-PASSOS, 2006). Entretanto, como já foi mencionado, a técnica de PCR apresenta algumas limitações na sua utilização no campo e dessa forma, o LAMP,

além de ser utilizado para o diagnóstico em humanos, também pode ser uma alternativa no monitoramento desses focos ativos (MESQUITA, 2021).

Sua aplicação no campo, entretanto, traz algumas preocupações, como a possibilidade de contaminação em condições do ambiente (MWANGI, 2018). Além disso, apresenta limitações que não permitem que se preencha os critérios para ser considerado como teste *point-of-care* pela OMS, visto que é necessário refrigeração para preservação dos reagentes. Para resolver essa limitação, grupos vêm desenvolvendo kits com reagentes secos, prontos para o uso e que seriam rápidos e simples de serem aplicados no campo; entretanto, é um processo longo e sofisticado. Além disso, a otimização para manutenção da estabilidade dos reagentes a longo prazo ainda não foi alcançada para que possa ser utilizado como ferramenta de *point-of-care* (GARCÍA-BERNALT, 2019).

2.4.4 Diagnóstico imunológico

Os métodos imunológicos podem ser classificados como diretos, quando identificam antígenos circulantes específicos; e indiretos, quando identificam anticorpos que foram produzidos na resposta imune contra o parasito (DE JONGE *et al*, 1991). Esses métodos têm se mostrado eficazes na identificação de indivíduos infectados com baixa intensidade de infecção, situações que podem levar a diminuição da sensibilidade por métodos coprocópicos e, assim, indivíduos infectados não são identificados (CHIEFFI; KANAMURA, 1978). Além disso, os métodos imunológicos também podem identificar precocemente infecções, visto que os métodos parasitológicos dependem do início da ovipostura (DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004). Durante vários estágios do ciclo de vida do parasito, são produzidos antígenos circulantes que podem ser identificados no soro dos pacientes pelos métodos diretos e são classificados de acordo com o estágio evolutivo do parasito: antígeno cercariano (ABDEL-HAFEZ *et al*, 1983), do ovo (RIPERT *et al*, 1988; HASSAN *et al*, 1992) e antígenos associados ao intestino do verme adulto (QIAN; DEELDER 1982; DEELDER *et al*, 1994). Já para a detecção de anticorpos, preparações antigênicas são produzidas em diferentes estágios evolutivos do parasito, cujos antígenos mais usados são SWAP (Soluble Worm Antigen Preparation), provenientes de vermes adultos e SEA (Soluble Eggs Antigen), que são antígenos solúveis dos ovos.

Estudos anteriores mostraram que os anticorpos no soro de pacientes possuíam efeitos *in vitro* contra o estágio de cercária; então, para estudar os efeitos do soro no estágio de ovo, foi feito o isolamento a partir de fígado de animais infectados para realização de experimentos *in vitro* (OLIVER-GONZÁLEZ, 1954). Nos anos seguintes, buscaram otimizar o protocolo de obtenção de antígenos do ovo a partir do fígado com algumas modificações na metodologia (COKER; LICHTENBERG, 1956). Em 1960, foi desenvolvido um novo método para superar a dificuldade de isolar ovos vivos em quantidade suficiente envolvendo a digestão do tecido animal primeiro por tripsina e depois por pepsina, que é capaz de digerir as fibras de colágeno deixando os ovos livres de tecido contaminante, sendo o uso dessas enzimas empregado nos protocolos até os dias atuais (SMITHERS, 1960). Buscando novas formas de isolamento dos ovos presentes nos tecidos animais sem contaminação bacteriana, um estudo utilizou de técnicas já estabelecidas de trituração e uso de enzimas, e fez uso de um filtro com lavagem eficiente dos ovos em um sistema fechado (BROWNE; THOMAS, 1963). Com o estabelecimento de protocolos cada vez mais otimizados, estudos utilizando antígenos obtidos do ovo isolado do fígado de animais infectados puderam ser realizados, trazendo informações sobre a imunologia da doença que antes não se conhecia (BOROS, 1970). Além disso, estudos sobre o desenvolvimento de vacinas contra a esquistossomose começaram a ser desenvolvidos agora com a possibilidade de obtenção e purificação de antígenos.

A técnica imunológica Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) foi descrita por Engvall e Perlmann em 1971, a partir dela foram desenvolvidas adaptações, incluindo a realização em placa de microtitulação (VOLLER, 1976; DOENHOFF; CHIODINI; HAMILTON, 2004). A técnica se baseia na sensibilização com antígenos de interesse, que se ligam a fase sólida, a microplaca ou tubos. A fase sólida deve ser capaz de não absorver outros componentes que sejam adicionados, além do antígeno ou anticorpo (ENGVALL; PERLMANN, 1971). A partir dessa base inicial, é possível desenvolver diferentes tipos de ELISA.

ELISA direto: A placa é sensibilizada com um anticorpo ou antígeno de interesse. Em seguida, é adicionado um anticorpo ligado a uma enzima. Também é disponibilizado nos poços o substrato da enzima, a partir da produção de mudança de cor será possível quantificar o teste. A coloração nos permite definir a quantidade de antígeno/anticorpo de interesse e a partir da absorbância, obtemos a densidade

óptica correspondente (ENGVALL; PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN; SCHUURS, 1971).

ELISA indireto: Após a sensibilização da placa com o antígeno de interesse, é adicionada a amostra de interesse. Caso a amostra possua os anticorpos que estão sendo pesquisados, ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo. Esses complexos são identificados a partir da adição de um anticorpo secundário, anti-imunoglobulina humana presente no complexo, assim como no ELISA direto, esse anticorpo também está ligado a uma enzima. Por último, é adicionado o substrato da enzima e é possível realizar a leitura (LINDSTROM; WAGER, 1978).

ELISA sanduíche: Nessa técnica as placas são sensibilizadas com anticorpos e a amostra é adicionada, se presente os antígenos que se deseja identificar, ocorre a ligação e formação dos complexos anticorpo-antígeno. Após processos de incubação e lavagem, é adicionado um anticorpo secundário ligado a uma enzima específico para aquele antígeno, assim como nas metodologias descritas anteriormente. Para possibilitar a visualização da atividade enzimática, é adicionado seu substrato. O substrato terá função de ser utilizado pela enzima e produzir mudança de cor no meio (KATO, 1977).

ELISA de competição: A placa é sensibilizada com o antígeno específico e a amostra que se deseja dosar é adicionada simultaneamente com o anticorpo ligado à enzima. O anticorpo marcado e o anticorpo não marcado (caso presente na amostra de interesse) competem entre si para se ligar ao antígeno que foi sensibilizado na placa. Por isso, há uma relação inversa entre a concentração do anticorpo que se quer pesquisar na amostra do paciente e a coloração final. Se o paciente possuir poucos anticorpos específicos ao antígeno sensibilizado na placa ou nenhum, o anticorpo marcado consegue se ligar ao antígeno em maior quantidade e, assim, quando adicionado o substrato, resultará na produção de coloração de grande intensidade e, consequentemente, alta absorbância. Por outro lado, se o paciente tiver grandes quantidades do anticorpo que está sendo buscado, ele se liga em maior quantidade ao antígeno, preenchendo os sítios de ligação e o anticorpo marcado não consegue se ligar, consequentemente, não produz coloração (YORDE, 1976).

Para superar as limitações das técnicas parasitológicas diferentes, alternativas vêm sendo aplicadas e o uso das técnicas imunológicas é uma delas. Antígenos brutos, como antígenos de ovos solúveis (SEA) e antígenos de vermes

(SWAP) são bastante utilizados em testes imunológicos com esse propósito, e a partir deles, são identificados no soro de indivíduos anticorpos específicos contra esses antígenos. A performance da detecção de IgG total no soro de pacientes crônicos em diferentes concentrações por ELISA utilizando SWAP, SEA e antígeno cercariano foi avaliada. Na concentração de 1:100, o SWAP obteve a melhor sensibilidade. Em 1:50 o SEA demonstrou ter melhor especificidade e o SWAP melhor sensibilidade, mostrando o potencial desses antígenos no imunodiagnóstico (SARHAN *et al*, 2014).

Embora apresentem algumas desvantagens, pois ambos os antígenos são produzidos como preparações de antígenos brutos, possuem alta homologia com antígenos de outros parasitas, o que pode resultar em reações de reatividade cruzada [DOENHOFF *et al*, 2004; ALARCÓN DE NOYA, 2000] e necessitam da manutenção do ciclo biológico do parasita. Além disso, após o tratamento realizado com sucesso, os ovos do parasita permanecem presos nos tecidos do hospedeiro e continuam estimulando o sistema imune devido aos antígenos liberados, assim, os níveis de anticorpos contra esses antígenos permanecem altos pós-tratamento e podem levar até dois anos para que possa voltar a níveis basais (BLIGH, 2010).

Ainda assim, a detecção de anticorpos por ELISA é uma ferramenta importante junto às técnicas parasitológicas, principalmente em áreas que são potenciais para transmissão e em localidades de baixa endemicidade, como já foi mencionado. Os antígenos SWAP e SEA, embora com suas limitações, ainda apresentam sensibilidade boa e podem diminuir a ocorrência de casos falso positivos quando complementar ao Kato-Katz em comparação a técnica sozinha (DA FROTA, 2011). A técnica ELISA é o teste mais frequentemente usado para sorologia e vem demonstrando alta sensibilidade, principalmente em locais de baixa endemicidade (GRENFELL *et al.*, 2013; OLIVEIRA; KANAMURA; CORREIA LIMA, 2005), sendo capaz de diferenciar entre pacientes na fase aguda e crônica (CAI, P. *et al.*, 2019). Os anticorpos específicos podem ser detectados no soro antes do início da ovipostura, o que justifica a sensibilidade superior das metodologias imunológicas em relação a coproscopia (HINZ, 2017). Além disso, também pode ser aplicado ao monitoramento de indivíduos que tiveram contato com áreas endêmicas sem histórico de exposição anterior, pois podem desenvolver inicialmente infecções agudas sem sintomas e a alta sensibilidade da técnica nessas situações pode resultar na identificação correta desses pacientes (ENK, 2010).

Além dos antígenos SWAP e SEA, também são usados no diagnóstico da esquistossomose os antígenos catódico (CCA) e anódico circulantes (CAA). Os dois antígenos proteoglicanos estão associados ao intestino do parasita, eles são liberados na circulação do hospedeiro pela regurgitação de conteúdos intestinais não digeridos através da ventosa oral do verme (HOCKLEY, 1973). O uso desses antígenos apresentam algumas vantagens, como sua presença poder ser identificada na urina (DISCH, 1997) e também podem indicar infecção ativa e, com isso, o tratamento pode ser aplicado adequadamente a indivíduos infectados (VAN LIESHOUT, 1994; DE CLERQ, 1997). Embora tenha sido encontrado em outras amostras biológicas, foi verificado que é melhor detectado na urina e que a sua concentração diminui rapidamente após tratamento quimioterápico (VAN'T WOUT, 1992; VAN LIESHOUT, 1993). O teste apresenta as vantagens de ter fácil execução, baixo custo e resultado rápido (BROOKER, 2005; RICHARDS, 2006). Embora o teste tenha apresentado uma satisfatória captura de antígeno, principalmente em pacientes com alta e moderada infecções (ADRIKO, 2014), os resultados em áreas de baixa endemicidade não são tão satisfatórios.

A utilização de anticorpos específicos contra antígenos de esquistossomos é bastante útil no diagnóstico e o ELISA permite a identificação desses anticorpos. Já foi avaliado anteriormente a relação entre anticorpos do tipo IgE e IgG4. Para dosagem dessas imunoglobulinas específicas contra SWAP, foi utilizado da técnica imunológica ELISA, em que foi observado que altos níveis de IgG4 em pacientes com cargas parasitárias maiores e maior proporção IgE/IgG4 em indivíduos não infectados ou com infecções leves (FIGUEIREDO *et al.*, 2012), o que é um achado relevante, pois na literatura há a sugestão de que esse subtipo IgG4 esteja associado a maior susceptibilidade (JIZ, 2009)

Sabendo da utilidade da identificação de anticorpos no diagnóstico da esquistossomose, o trabalho buscou desenvolver métodos imunológicos para sua detecção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver protocolo para validar métodos de diagnóstico para a esquistossomose mansônica baseados na detecção de imunoglobulinas (IgM e IgG) humanas no laboratório de Referência em

Esquistossomose/Fiocruz-PE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Infectar camundongos para manutenção do ciclo biológico do *S. mansoni* para obtenção de vermes adultos;
- II. Produzir antígenos solúveis a partir dos vermes adultos de *S. mansoni* para detectar imunoglobulinas em soro de pacientes com esquistossomose mansônica;
- III. Padronizar o método de “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) para detecção de IgM e IgG específicas para antígenos de vermes adultos de *S. mansoni*;
- IV. Realizar inquérito epidemiológico (método de Kato-Katz) para validar o teste de ELISA para diagnóstico imunológico em indivíduos de área endêmica;
- V. Correlacionar os níveis de imunoglobulina com a carga parasitária, sexo e idade dos indivíduos.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental com corte transversal para validar o método de ELISA para detecção de imunoglobulinas humanas (IgM e IgG) em soro de 345 indivíduos que residem em área endêmica para infecção pelo *S. mansoni*.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo visou padronizar o método de diagnóstico para a esquistossomose mansônica baseado na detecção de imunoglobulinas humanas (ELISA para detectar IgM e IgG) em indivíduos que residem em área endêmica de Pernambuco. O estudo faz parte de um projeto maior (*Validação de Modelos de Risco para Transmissão e Endemização da Esquistossomose: 20 anos de estudo em Porto de Galinhas - PE*), correspondendo ao objetivo b do estudo (*Determinar a prevalência, intensidade da infecção e forma clínica da esquistossomose, bem como identificar o padrão de distribuição espacial dos casos humanos*), que foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, sob o número CAAE: 02075118.0.0000.5190 (ANEXO A). Os procedimentos que envolvem animais de experimentação foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Sob o número 123/2017 (ANEXO B).

4.3 ÁREA DE ESTUDO E LOCALIDADES

O estudo foi desenvolvido na localidade Porto de Galinhas, município de Ipojuca, litoral sul do estado de Pernambuco, distando cerca de 60 km do Recife - PE. O município de Ipojuca faz fronteira com os municípios de Cabo de Santo Agostinho, Escada e Sirinhaém e tem uma área territorial de 532 km², e população de aproximadamente 94 mil habitantes. A localidade de Porto de Galinhas é uma área de baixa endemicidade para esquistossomose e foi escolhida a partir dos registros de criadouros de *Biomphalaria glabrata* e do elevado número de casos de esquistossomose que vem sendo notificados ao longo dos últimos 20 anos pelo Laboratório de Referência em Esquistossomose do IAM/Fiocruz. Para o inquérito de soroprevalência da esquistossomose, foi considerada como localidade de Porto de Galinhas os bairros Merepe I, II e III; Salinas, Socó, Pantanal e Vila de Porto.

4.4 METODOLOGIA DO OBJETIVO 1: INFECTAR CAMUNDONGOS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO *S. MANSONI* E PARA OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS

Para a infecção dos camundongos foi utilizado a cepa LE de *Schistosoma mansoni*, proveeniente de caramujos *Biomphalaria glabrata* criados no Laboratório de Referência em Esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE. Aproximadamente 20 caramujos infectados em um béquer com água livre de cloro foram expostos à fonte luminosa incandescente por 60 minutos para liberação das cercárias do *S. mansoni* (SOUZA *et al.*, 1990). Posteriormente, foi coletada uma alíquota de 1 mL da água para contagem das cercárias com o auxílio de uma lupa estereoscópica e a amostra foi corada com uma solução de Lugol à 10%. Ao determinar o quantitativo de cercária existente em 1 mL, foram realizados cálculos por regra de três para saber o volume a ser utilizado para infectar cada camundongo com aproximadamente 100 cercárias.

Foram utilizados camundongos heterogênicos (machos ou fêmeas), da linhagem Swiss Webster, com 7-8 semanas de idade, provenientes do biotério do Instituto Aggeu Magalhães - IAM/FIOCRUZ. Os animais experimentais foram mantidos em gaiolas (20 animais por gaiola), sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C), luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro), com comida e água *ad libitum*. Os camundongos foram colocados em frascos de vidro individuais de boca larga (capacidade de 300ml), com tampas aeradas (furadas), contendo água que cubra as patas e a cauda (aproximadamente 6 mL de água desclorada na base adicionadas 100 cercárias da linhagem LE). Os animais ficaram em contato com as cercárias por 60 minutos, sob fonte de luz artificial direta, facilitando a penetração do patógeno, em temperatura de 25 °C. Foi realizada uma infecção por mês de 20 camundongos com a linhagem LE, procedimento que já é rotina do laboratório. Após o procedimento, os animais foram devolvidos para suas caixas e mantidos com água e alimentação *ad libitum* e sob observação constante no biotério de experimentação animal do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE.

Depois de 45 dias da data de infecção, os camundongos foram colocados individualmente em caixas de polipropileno branco fosco (13x30x20 cm) para coleta de fezes. Os animais foram deixados por 40 minutos nas caixas limpas e sem maravalha. Os pellets de fezes de cada animal foram coletados e armazenados em microtubos para posterior análise parasitológica. O exame parasitológico de fezes foi realizado por meio da técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972)

com o Kit Helm Test fabricado pela Biomanguinhos, seguindo as instruções contidas na bula do produto. Para a técnica, é utilizada solução de verde-malaquita, em que pedaços de celofane medindo 24x30 mm ficaram mergulhados por pelo menos 24 horas. É utilizado uma pequena amostra de fezes e com auxílio da espátula é comprimido contra a malha de náilon (trama 0,9 mm). As fezes que passaram pela tela são transferidas para o orifício da placa perfurada disponibilizada no kit e comprimidas para se espalharem em cima da lâmina de vidro. É colocada agora a lamínula que estava embebida na solução e é feita pressão com o polegar sobre a lâmina, entre a lâmina de vidro e a lamínula de fezes, de modo que o material se espalhe uniformemente, evitando que as fezes extravasem. É necessário aguardar de 1 a 2 horas e examinar ao microscópio de campo claro e o resultado é multiplicado por uma constante no valor de 24 para obter o número expresso em ovos por grama de fezes (OPG).

Após noventa dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia por meio da sobredosagem de anestésicos Xilazina, Cetamina e Tiopental. Em seguida, realizou-se a perfusão com Solução Tampão Fosfato (PBS) do sistema venoso portal, através de incisão próximo aos órgãos genitais indo até a caixa torácica. Em seguida, cortou-se a veia porta e perfundeu-se o ventrículo esquerdo para retirada dos vermes adultos.

4.5 METODOLOGIA DO OBJETIVO 2: PRODUZIR ANTÍGENOS SOLÚVEIS A PARTIR DOS VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI* PARA DETECTAR IMUNOGLOBULINAS EM SORO DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Após eutanásia dos camundongos infectados e coleta dos vermes adultos, foram separados os machos das fêmeas para evitar a mistura com antígenos de ovos. Foram transferidos 200 vermes adultos machos para um tubo tipo Falcon de 5mL e adicionado 4mL de Tampão fisiológico Tris-CHAPS-Inibidor de protease.

Foram adicionados 100 beads de zirconium (1,4 mm) e, em seguida, colocado o tubo no disruptor de células e tecidos L-BEADER 6. O equipamento foi programado com 9 ciclos e tempo de agitação de 30 segundos, mais repouso de 30 segundos, usando a velocidade de 4000 RPM. Em seguida, foi utilizado o Thermoblock com 500 RPM por 5 minutos e feito centrifugação final com 5000 RPM por 5 minutos para retirada do sobrenadante.

Por fim, foi realizada a dosagem das proteínas obtidas utilizando o kit de ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, EUA) no sobrenadante obtido. Foi realizada uma curva com albumina padrão antes da dosagem das proteínas. Além disso, foi realizada a eletroforese utilizando gel de SDS para verificar o padrão das bandas geradas.

4.6 METODOLOGIA DO OBJETIVO 3: PADRONIZAR O MÉTODO DE “ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY” (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgM E IgG ESPECÍFICAS PARA ANTÍGENOS DE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*

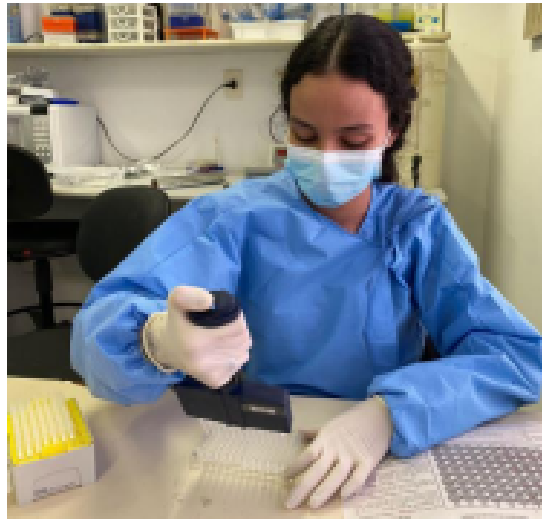
O ELISA indireto foi utilizado para detecção de anticorpos IgM e IgG total específicos para vermes adultos (SWAP) de *S. mansoni*. As placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com os antígenos na concentração de 10µg/mL diluídos em tampão Carbonato-Bicarbonato (100µL/poço) e incubadas overnight a 4 °C. No dia seguinte, realizou-se três lavagens com solução PBS-Tween 0,05% e bloqueio com a adição de 150µL de PBS Tween-Leite 3% em cada poço e incubação por 1h à 37 °C. Em seguida, realizou-se três lavagens com PBS-Tween 0,05% e adicionou-se 100µL por poço do soro dos indivíduos, em duplicatas, diluídos e incubação por 1h à 37 °C. Posteriormente, nova etapa com três lavagens foi realizada e adicionou-se 100µL/poço do anti-IgM e anti-IgG total humano, biotilado, produzido em ratos, diluído, em PBS-Tween-Leite 1% e incubação por 1h a 37 °C (Figura 7). Após nova etapa com três lavagens, adicionou-se 100µL/poço da solução de Streptavidina Peroxidase diluída em PBS-Tween-Leite 1% e incubação por 1h à 37 °C. Após três lavagens, adicionou-se 100µL/poço da solução de revelação com OPD (Orthophenylenediamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvido em tampão tris-citrato 0,1M (pH 5,5) e H₂O₂, e incubou-se em câmara úmida escura por 20 minutos.

Durante os experimentos iniciais para padronização do ensaio, foram utilizadas diferentes concentrações de antígeno SWAP (2,5, 5,0 e 10 µg/mL), diluições dos anticorpos anti-IgM e anti-IgG total (1:60.000, 1:50.000; 1:10.000 e 1:1.000) e diluição da Streptavidina-Peroxidase (1:10.000, 1:5.000 e 1:1000).

Para leitura, utilizou-se filtro de 450nm sem solução de parada para obtenção da densidade óptica (D.O.), e, após adição da solução (50µL de H₂SO₄ a 3N), realizou-se uma segunda leitura com o filtro de 492 nm. A figura 8 mostra um esquema resumindo as etapas de realização do ELISA. Soros de indivíduos de área

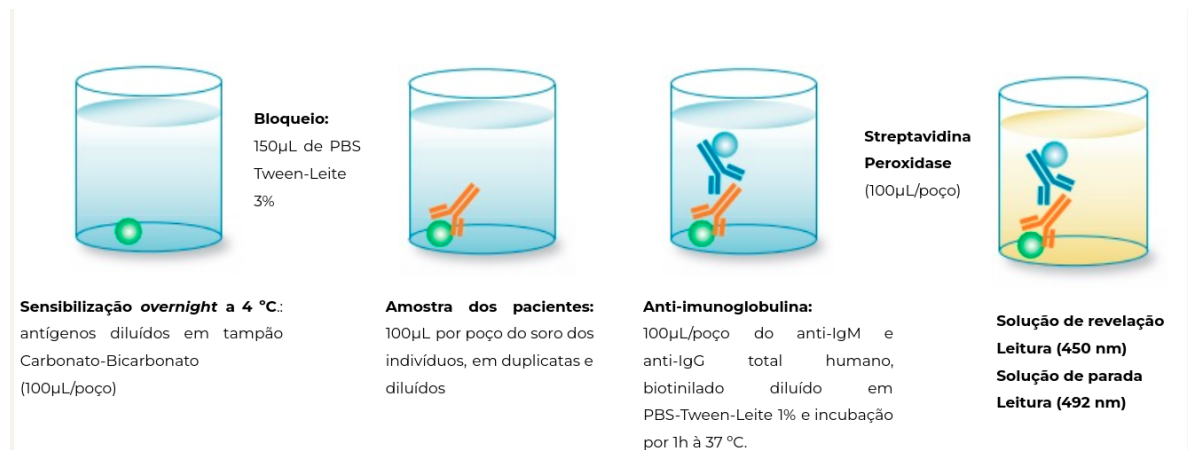
não endêmica e negativos para *S. mansoni* pelo Kato-Katz e de nested-PCR foram utilizados para cálculo do ponto de corte (*Cut-Off*), obtido por meio da média dos soros controle adicionados de duas vezes o desvio padrão.

Figura 7: Realização do ELISA no Laboratório de Referência em Esquistossomose.



Fonte: o autor.

Figura 8: Esquema das etapas do ELISA.



Fonte: o autor.

4.7 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO 4: REALIZAR INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO (MÉTODO DE KATO-KATZ) PARA VALIDAR O TESTE DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA

Os pacientes foram recrutados para participar do estudo por meio de convite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A seleção foi

realizada por meio da aplicação do questionário para coleta de variáveis biológicas (sexo, idade, local de residência); em seguida, foram distribuídos potes coletores de fezes para realização do exame parasitológico de fezes por meio dos métodos de Kato-Katz com leitura de 2 lâminas por indivíduo. As amostras de fezes coletadas foram analisadas no Laboratório de Referência em Esquistossomose (LRE) do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Os resultados dos pacientes foram encaminhados para o posto de saúde para o tratamento específico dos indivíduos parasitados. Nesse momento, foram recrutados para coleta de sangue, que foi pelo método de venopunção da veia cubital para coleta de 10 ml de sangue. As amostras foram então centrifugadas a 5.000 RPM para armazenar o soro a -20°C para posterior dosagem de imunoglobulinas por meio da metodologia do objetivo específico 3.

4.8 METODOLOGIA DO OBJETIVO ESPECÍFICO 5: CORRELACIONAR OS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINA A CARGA PARASITÁRIA, SEXO E IDADE DOS INDIVÍDUOS

Foi realizada uma análise de correlação entre os níveis de anticorpos (D.O.) IgM e IgG e a carga parasitária, idade dos indivíduos. Utilizou-se regressão linear simples e o teste de correlação de Spearman. Os testes estatísticos serão considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$. Foram utilizados os softwares R e GraphPad Prism 5.0 para as análises.

5 RESULTADOS

5.1 INFECTAR CAMUNDONGOS PARA MANUTENÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO DO *S. MANSONI* E PARA OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS

A infecção dos camundongos foi avaliada pela leitura de exame parasitológico de fezes dos animais pelo método de Kato-Katz. A partir do exame (Tabela 1), foi observada uma carga parasitária leve (até 100 ovos/g de fezes), o que possibilitou a continuidade dos estudos e evitou que os animais ficassem debilitados rapidamente. A manutenção do ciclo do *S. mansoni* a partir da infecção de camundongos é necessária, uma vez que não é possível manter o ciclo *in vitro*.

Tabela 1: Resultado do parasitológico de fezes dos animais infectados pelo método de Kato-Katz.

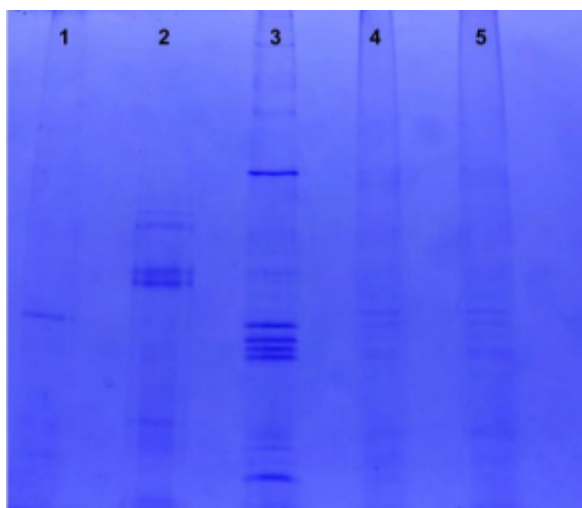
Camundongo	Quant. de ovos Lâmina 1	Quant. de ovos Lâmina 2	Ovos por grama (OPG)
01	03	02	60
02	01	01	24
03	02	01	36
04	01	01	24
05	01	01	24
06	01	04	60
07	03	01	48
08	01	01	24
09	02	03	60
10	03	05	96

Fonte: o autor.

5.2 PRODUIR ANTÍGENOS SOLÚVEIS A PARTIR DOS VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI* PARA DETECTAR IMUNOGLOBULINAS EM SORO DE PACIENTES COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Conforme descrito na metodologia, após a última centrifugação, utilizou-se a técnica do BCA para dosagem de proteínas, em que foi possível obter um concentrado antigênico 440 µg/mL para uso nas reações. A eletroforese das proteínas para conferir a integridade das proteínas do extrato foi realizada em gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie e lido através de luz branca na Figura 9. O antígeno SWAP obtido através dos vermes adultos machos se encontra na coluna 3.

Figura 9: Eletroforese dos antígenos de cercária (1), ovos (2), vermes adultos macho (3) e fêmea (4 e 5).



Fonte: O autor.

5.3 PADRONIZAR O MÉTODO DE “ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY” (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgM E IgG ESPECÍFICAS PARA ANTÍGENOS DE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*

Foi identificado as melhores condições para o ELISA nas concentrações do antígeno de 10 µg/mL e diluição dos conjugados e Streptavidina-Peroxidase de 1:1.000, que foram então utilizadas durante todas as dosagens seguintes.

5.4 REALIZAR INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO (MÉTODO DE KATO-KATZ) PARA VALIDAR O TESTE DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS DE ÁREA ENDÊMICA

Para realização da produção de antígeno e do ELISA, foi realizado o inquérito epidemiológico, em que foram coletadas amostras de fezes de 2.028

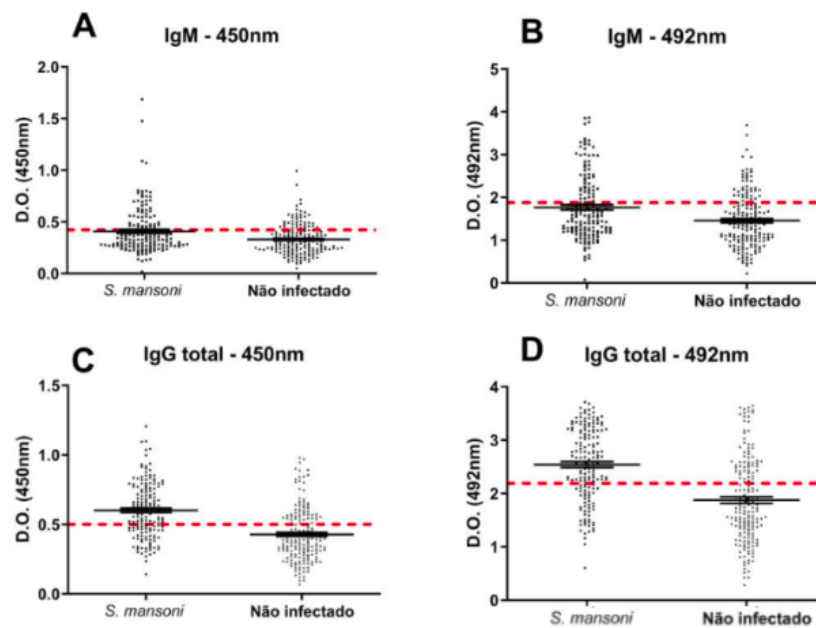
indivíduos e amostras de sangue de 345 indivíduos residentes dos bairros de Salinas, Merepe, Pantanal e Socó em Porto de Galinhas. Dos participantes, 51% (177/345) eram do sexo feminino, 49% (167/345) do sexo masculino e a média de idade foi de 32 anos. Desse grupo, 165 indivíduos eram positivos para infecção por *Schistosoma mansoni* de acordo com o método de diagnóstico parasitológico Kato-Katz.

As amostras de sangue obtidas foram processadas e armazenadas. Após a padronização do ELISA, as amostras de soro foram utilizadas para validação do teste utilizando as definições obtidas mencionadas subtópico 4.3. A leitura da absorbância das placas foi realizada em leitor de ELISA utilizando os filtros de 450 nm e 492 nm para, dessa forma, calcular a densidade óptica (D.O.). Os resultados apresentados na Figura 10 abaixo demonstram a comparação dos níveis de IgM e o IgG total Anti-SWAP entre indivíduos infectados por *S. mansoni*, detectados no método Kato-Katz, e indivíduos não infectados. Cada ponto no gráfico representa a densidade óptica (eixo y) obtida pelo leitor de ELISA referente a um paciente nos infectados por *S. mansoni* e não infectados (eixo x). A linha preta escura representa a média (com o DP) e o tracejado vermelho o ponto de corte.

O resultado obtido com a padronização do ELISA está apresentado na Figura 10. Na figura 10A e 10B, observa-se os níveis de IgM anti-SWAP, com o filtro de 450 nm e 492 nm, respectivamente. Na leitura em 450 nm, foi demonstrada diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos de indivíduos infectados e não infectados. A média obtida no grupo infectado foi 0,4087 (DP $\pm$ 0,2209), enquanto o grupo não infectado apresentou média de 0,3295 (DP $\pm$ 0,1465). Com relação a leitura em 492 nm, também houve diferença significativa e a média foi de 1,766 (DP $\pm$ 0,7531) nos infectados; no grupo dos não infectados, a média foi de 1,455 (DP $\pm$ 0,6304).

Na figura 10C e 10D, observa-se a detecção da IgG com o filtro de 450nm e 492nm, respectivamente. Com relação a leitura em 450 nm, também houve diferença significativa ($p < 0,0001$) e a média foi de 0,6014 (DP $\pm$ 0,1957) nos infectados; no grupo dos não infectados, a média foi de 0,4285 (DP $\pm$ 0,1933). Na leitura em 492 nm, foi demonstrada diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos de indivíduos infectados e não infectados. A média obtida no grupo infectado foi 2,543 (DP $\pm$ 0,6918), enquanto o grupo não infectado apresentou média de 1,879 (DP $\pm$ 0,7918).

Figura 10: Comparação das densidades ópticas dos anticorpos IgM e IgG entre indivíduos infectados por *S. mansoni* e não infectados.



Fonte: o autor.

O teste do Chi-quadrado com teste exato de Fisher foi realizado nas duas leituras, para verificar a associação dos níveis de anticorpos IgM (Tabela 2) e IgG total (Tabela 3) nos grupos de pacientes infectados pelo *S. mansoni* e o grupo não infectado e para avaliação da sensibilidade e especificidade. Além disso, também foi avaliado o Odds Ratio (OR), IC 95% e o valor de p obtido nas duas leituras.

Tabela 2: Comparação das densidades ópticas de anticorpos IgM total anti-SWAP nos grupos de pacientes infectados por *S. mansoni* e o grupo dos não infectados e avaliação do Odds Ratio (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%), sensibilidade, especificidade e valor de p, obtidos nas leituras de 450 nm e 492 nm.

		S. <i>mansoni</i> N (%)	Não infectado N (%)	Total N (%)	OR	IC95%	Sensibilidade	Especificidade	Valor de p*
450 nm	IgM +	74 (44,85)	25 (13,96)	99 (28,78)	5,009	2,946 - 8,285	44,85%	86,03%	<0,0001
	IgM -	91 (55,15)	154 (86,04)	245 (71,22)					
	Total	165 (100)	179 (100)	344 (100)					
492 nm	IgM +	76 (46,06)	27 (15,08)	103 (29,95)	4,807	2,880 - 8,032	46,06%	84,92%	<0,0001
	IgM -	89 (53,94)	152 (84,92)	241 (70,05)					
	Total	165 (100)	179 (100)	344 (100)					

* Diferença significativa quando valor de $p < 0,05$ pelo teste do Chi-quadrado com teste exato de Fisher.

Fonte: o autor.

Tabela 3: Comparação das densidades ópticas de anticorpos IgG total anti-SWAP nos grupos de pacientes infectados por *S. mansoni* e o grupo dos não infectados e avaliação do Odds Ratio (OR), intervalo de confiança de 95% (IC95%), sensibilidade, especificidade e valor de p, obtidos nas leituras de 450 nm e 492 nm.

		S. <i>mansoni</i> N (%)	Não infectado N (%)	Total N (%)	OR	IC95%	Sensibilidade	Especificidade	Valor de p*
450 nm	IgG total +	115 (48,11)	55 (52,38)	170 (49,41)	0,8431	0,5339 - 1,345	69,70%	69,27%	<0,0001
	IgG total -	50 (51,89)	124 (47,61)	174 (50,59)					
	Total	165 (100)	179 (100)	344 (100)					
492 nm	IgG total +	119 (72,12)	61 (34,07)	180 (52,32)	5,004	3,186 - 7,907	72,12%	65,92%	<0,0001
	IgG total -	46 (27,88)	118 (65,93)	164 (47,67)					
	Total	165 (100)	179 (100)	344 (100)					

* Diferença significativa quando valor de $p < 0,05$ pelo teste do Chi-quadrado com teste exato de Fisher.

Fonte: o autor.

5.5 CORRELACIONAR OS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINA A CARGA PARASITÁRIA, SEXO E IDADE DOS INDIVÍDUOS

Para correlação dos níveis de IgG total com sexo, idade e carga parasitária, foi realizada análises por meio do teste Chi-quadrado com teste exato de Fisher. A leitura de 492 nm foi escolhida para essa análise, pois apresentou melhor resultado, exibindo diferenças entre os infectados e não infectados pelo teste de Mann-Whitney. Os dados obtidos das correlações no grupo dos infectados estão apresentados na Tabela 4, onde valor de p significativo foi obtido apenas na análise comparando anticorpos e idade, onde a comparação do grupo de indivíduos com menos de 19 anos e o grupo de 20 a 59 anos nos deu um valor de p de 0,0011. As análises avaliando a correlação com os outros grupos não apresentaram valor significativo estatisticamente.

Tabela 4: Correlação entre os indivíduos positivos para o IgG Anti-SWAP e o sexo, idade e carga parasitária de infectados através de análise univariada pelo Chi-quadrado na leitura de 492 nm.

Variáveis socio-demografia e carga parasitária		<i>S. mansoni</i> N (%)		Total N (%)	OR	IC95%	Valor de p*
		IgG +	IgG -				
Sexo	Masculino	73 (69,5%)	32 (30,4%)	105 (100%)	0,7604	0,366- 1,533	0,4794
	Feminino	45 (75%)	15 (25%)	60 (100%)			
	Total	118 (100)	46 (100)	165 (100)			
Idade	≤19 anos	40 (90,9%)	4 (9,09%)	44 (100%)	-	-	-
	20 ≤ 59 anos	69 (65,0%)	37 (34,9%)	106 (100%)	5,362	1,856 - 14,75	0,0011
	≥ 60 anos	10 (66,6%)	5 (33,3%)	15 (100%)	0,9324	0,3353 - 2,815	>0,999
	Total	118 (100)	46 (100)	165 (100)			
Carga Parasitária	≤ 99 O.P.G	64 (66,3%)	34 (34,7%)	98 (100%)	0,4563	0,1978 - 1,100	0,1046
	100 ≥ 399 O.P.G.	33 (80,5%)	8 (19,5%)	41 (100%)			
	≥ 400 O.P.G.	21 (80,8%)	5 (19,2%)	26 (100%)			
	Total	118 (100)	47 (100)	165 (100)			

Fonte: o autor.

As análises estatísticas no grupo dos não infectados estão representadas na Tabela 5. Em todas as análises realizadas, não foi obtido valor de p significativo estatisticamente.

Tabela 5: Correlação entre os indivíduos positivos para o IgG Anti-SWAP e o sexo e idade de não infectados através de análise univariada pelo Chi-quadrado na leitura de 492 nm.

Variáveis socio-demografia e carga parasitária		Não infectado		Total N (%)	OR	IC95%	Valor de p*
		N (%)					
		IgG +	IgG -				
Sexo	Masculino	24 (38,7%)	38 (61,2%)	62 (100%)	1,383	0,7124 - 2,619	0,3261
	Feminino	37 (31,3%)	81 (68,6%)	118 (100%)			
	Total	61 (100)	119 (100)	180 (100)			
Idade	≤19 anos	15 (25,4%)	44 (74,6%)	59 (100%)	0,4951	0,2429 - 1,027	0,0603
	20 ≤ 59 anos	42 (40,8%)	61 (59,2%)	103 (X%)			
	≥ 60 anos	4 (22,2%)	14 (77,8%)	18 (X%)			
	Total	61 (100)	119 (100)	180 (100)			

Fonte: o autor.

6 DISCUSSÃO

A população que vive em regiões de baixa endemicidade para a esquistossomose mansônica pode estar exposta a infecção e não ter conhecimento disso, implicando que a doença venha a se manifestar tardiamente e levando a uma alta morbidade para esta população. Adicionalmente, esses indivíduos infectados, e quando desconhecem a sua própria infecção, contribuem para perpetuar a doença no ambiente e manter a população em situação de risco. Mesmo com os esforços para reduzir a prevalência da esquistossomose (tratamento em massa, melhorias de saneamento básico, educação em saúde e outros) ainda não foi possível eliminar a doença na região, onde a urbanização vem sendo mostrada como uma das razões para mudança no perfil de transmissão e persistência da doença (SOUZA *et al.*, 2021).

Aqui neste trabalho, conseguimos padronizar uma metodologia que pode auxiliar na identificação precoce de indivíduos com esquistossomose. Nos resultados, observamos que foi possível identificar 119 indivíduos dentre os pacientes positivos pelo método de identificação de referência KK, tendo uma sensibilidade de 72,12% e especificidade de 65,92%. Nos resultados foi observado baixa sensibilidade (em torno de 45%), utilizando a detecção de anticorpos do tipo IgM, sendo esta imunoglobulina predominante no início das infecções, sendo um marcador de infecção aguda. O antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) vem sendo estudado há décadas (DOENHOFF *et al.*, 1981), e induz sensibilização em animais experimentais com produção de anticorpos satisfatórios, sendo assim, configura um bom candidato a uso no imunodiagnóstico. Com o processo de sonificação e centrifugação, foi possível obter um concentrado antigênico de 440 µg/mL para uso nas reações.

Estudos realizados por nosso grupo tiveram início na região há décadas atrás. No início dos anos 2000, cheias que afetaram a população resultaram no maior número de casos agudos já registrados mundialmente (BARBOSA *et al.*, 2001). Dez anos após esse acontecimento, um inquérito epidemiológico foi realizado pelo grupo, em que foi observado que a área se encontrava endêmica para esquistossomose (BARBOSA *et al.*, 2011). Em 2020, entre 2 mil indivíduos participantes do inquérito, que tiveram suas amostras de fezes analisadas, 165 indivíduos com microscopia positiva pela técnica de Kato-Katz tiveram amostra de

sangue coletada para realização do ELISA. É visto que a prevalência da doença na região vem diminuindo, aproximadamente 50% em relação ao último estudo feito uma década atrás (GOMES *et al.*, 2021).

Nos nossos resultados, foi observado interferência da idade no grupo dos infectados ($p = 0,0011$ e $OR = 5,362$ com $IC95\% 1,856 - 14,75$) e não houve no grupo dos negativos. Foi visto que quanto mais velho, mais suscetível a ter um resultado positivo. No nosso estudo, não foi demonstrado relação entre carga parasitária e positividade no teste imunológico. A relação positiva entre isótopos de IgG e esquistossomose severa vem sendo relatada em estudos anteriores (SILVEIRA, 2004). Em um estudo publicado em 2014 por Negrão-Corrêa *et al.*, foi visto que a positividade de IgG contra SWAP estava relacionado à esquistossomose, entretanto, sem relação com carga parasitária.

Para auxiliar na eliminação da doença, é essencial que métodos de diagnósticos complementares a microscopia estejam disponíveis, sabendo das limitações que o KK apresenta. O estudo buscou, então, desenvolver métodos imunológicos indiretos para detecção de anticorpos que pudessem ser utilizados na rotina de diagnóstico. A escolha dos antígenos empregados em ensaios imunológicos, como o ELISA, é uma das principais etapas para produção de testes que apresentem boa sensibilidade e especificidade, uma vez que é necessário que o antígeno escolhido induza a produção *in vivo* de anticorpos para que possam ser detectados (HINZ *et al.*, 2017). A utilização de anticorpos para o diagnóstico da esquistossomose é dificultada devido a algumas limitações, principalmente em locais de baixa endemicidade. Os antígenos brutos possuem muitas proteínas que podem resultar em reatividade cruzada em indivíduos de áreas co-endêmicas expostos aos geohelmintos e, devido a homologia antigênica, apresentada em alguns parasitas, gerando reatividade cruzada (GRENFELL *et al.*, 2013). Além disso, os métodos imunológicos se baseiam na detecção de anticorpos, podendo ser um resíduo da memória imunológica e que nem sempre reflete um caso ativo como exposto por SILVA-MORAES *et al.* 2019 e VENDRAME *et al.*, 2001, sendo difícil de discriminar em uma infecção ativa a uma memória imunológica. A presença dos ovos nos tecidos do hospedeiro, mesmo após a cura, pode manter anticorpos contra o SEA em altos níveis por meses (BLIGH *et al.*, 2010). Esses fatores podem ser responsáveis pela obtenção de testes com resultados com baixa sensibilidade e que não conseguem distinguir significativamente grupos de infectados e não infectados.

Para otimizar a performance desses testes imunológicos, podem ser utilizados antígenos recombinantes, produzidos utilizando a tecnologia de clonagem de DNA para expressar um gene de interesse e produzir proteínas em diferentes sistemas e vetores, como bactérias e leveduras. Essa metodologia traz a possibilidade de produzir proteínas em grande escala, com menor custo e maior atividade biológica, pontos importantes a serem considerados para a produção de testes para o diagnóstico e vacinas. A bactéria *Escherichia coli* é uma das primeiras e mais utilizadas como sistema de expressão para produção de proteínas (TERPE, 2006). Algumas de suas vantagens são: crescimento e expressão rápidos, facilidade no manuseio, baixo custo e geneticamente bem caracterizada (SCHAECHTER, 2001; DEMAÏN; VAISHNAV, 2009). Os primeiros relatos da utilização dessa tecnologia com genes de *Schistosoma* utilizaram as bactérias como vetores. O artigo de Henkle (1990) utilizou das proteínas glutathione S-transferases (GSTs) de 28 e 26-kDa presentes em *S. japonicum* e em *S. mansoni*, produzidos em sistemas de expressão bacterianos para realização de estudos imunológicos. Algumas desvantagens nesse sistema são, como exemplo, as proteínas podem ser produzidas nas formas de corpos de inclusão, os quais geralmente são insolúveis, necessitando de processos de redobragem e purificação, ou inativas. Além disso, não são capazes de realizar modificações pós-tradução eucarióticas para o dobramento correto e maturação de proteínas (DEMAÏN; VAISHNAV, 2009), o que encarece a produção.

A possibilidade de utilizar antígenos recombinantes pode trazer maior sensibilidade aos testes imunológicos, ao produzir proteínas que não possuam reação cruzada com outros antígenos e nem induzem respostas longas, assim, diminuindo os falsos positivos por memória imunológica. Um estudo buscou avaliar a utilidade potencial de nove proteínas recombinantes de *S. mansoni*, para o diagnóstico imunológico da doença, avaliando a cinética de anticorpos contra cada antígeno em camundongos antes e após o tratamento. Foi observado que alguns antígenos induzem resposta cedo e que diminuem significativamente após o tratamento, identificando antígenos candidatos com potencial utilidade no monitoramento e vigilância da esquistossomose para a eliminação da esquistossomose (MOHAMMED, 2020).

Além dos sistemas bacterianos, é possível utilizar leveduras para expressão de proteínas de interesse, como exemplo, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e

Pichia pastoris (KARBALEEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). A *P. pastoris* possui genes codificadores da enzima álcool oxidase (AOX) e na presença de metanol, a transcrição desses genes é induzida fortemente, tendo isso em vista, a abordagem mais comumente usada é expressar o gene de interesse sob o controle do promotor AOX1 (CEREGHINO *et al.*, 2012). Os autores no trabalho de Damasceno e colaboradores (2017) buscaram avaliar a expressão da proteína Sm14 na levedura, uma vez que essa proteína já tinha sido produzida anteriormente em sistema bacteriano, mas não obteve rendimento ideal, pois apresentava-se em corpos de inclusão e o redobrimento era necessário, visto que a antigenicidade parecia estar dependente da conformação dos epítomos (TENDLER *et al.*, 2017). O Sm14 recombinante processado corretamente foi secretado no meio de cultura em níveis de aproximadamente 250 mg/L⁻¹ e um protocolo de purificação composto por duas etapas obteve recuperação de 37,6% da proteína secretada no meio de cultura, apresentando pureza superior a 95%. A proteína produzida pelo sistema é utilizada nos testes clínicos de fase II com *rSm14*, uma das proteínas candidatas a utilização na vacinação contra esquistossomose.

Mesmo com algumas limitações, as técnicas imunológicas conseguem identificar pacientes com baixas cargas parasitárias, que seriam diagnosticados como negativos, devido a sensibilidade diminuída do parasitológico nessas situações (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2015) e vêm demonstrando alta sensibilidade em localidades de baixa endemicidade (GRENFELL *et al.*, 2013). A utilidade dos métodos imunológicos é demonstrada em estudos que descrevem que indivíduos que possuíam resultado negativo pelo KK e positivo para anticorpos se tornaram positivos na microscopia após aumento do número de lâminas lidas (DA FROTA, 2011), a leitura de múltiplas lâminas, entretanto, tem aumento do custo e de tempo. É de grande importância a padronização do protocolo do teste ELISA realizado no trabalho, sendo necessário a realização de futuros experimentos, podendo incluir outra metodologia de produção de antígenos mais sofisticada. Uma vez produzido, o teste beneficiaria, principalmente, populações endêmicas de baixa carga parasitária que não são identificadas a partir de testes parasitológicos convencionais, devido a sensibilidade diminuída nessas situações (BARENOLD *et al.*, 2017). Uma vez identificados, o tratamento pode ser realizado precocemente e impedir que as manifestações mais graves associadas a uma alta morbidade se apresentem tardiamente. Assim, o produto pode ser utilizado na rotina dos serviços de saúde

para atender às necessidades de diagnóstico nos casos inconclusivos da doença e nos inquéritos soropidemiológicos que podem vir a ser realizados.

7 CONCLUSÃO

O antígeno SWAP obtido a partir de vermes adultos machos pode ser um candidato para detecção de anticorpos em indivíduos de área endêmica. Com o protocolo ELISA desenvolvido no laboratório foi possível validar o método e sua padronização e aperfeiçoamento é de grande importância para a obtenção de um teste que possa solucionar casos duvidosos. Deste modo, pode-se reduzir os resultados falsos negativos causados pela baixa sensibilidade das técnicas parasitológicas empregadas em localidades de baixa endemicidade. O estudo conseguiu obter um concentrado de SWAP de 440 ug/mL. A dosagem de IgG, na leitura de 492 nm, mostrou-se capaz de diferenciar os indivíduos infectados e não infectados, com sensibilidade 72,12% e especificidade de 65,92%. Contudo, são necessários futuros experimentos e novas análises estatísticas que possam fortalecer os resultados obtidos no trabalho e trazer ainda mais informações sobre o método desenvolvido e sua aplicabilidade. Um teste imunológico sensível pode ser capaz de detectar indivíduos infectados em localidades de baixa prevalência e auxiliar nos programas de eliminação da esquistossomose.

REFERÊNCIAS

1. ABBASI, *et al.* Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2010, v. 83, p. 427–432. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0764>>. Acesso em 06 Jan 2022.
2. ABDEL-HAFEZ, S. K.; PHILLIPS, S. M.; ZODDA, D. M. *Schistosoma mansoni*: detection and characterization of antigens and antigenemia by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Experimental in Parasitology**, 1983, v. 55, p.219-232. Disponível <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014489483900164>>. Acesso em 03 Mar 2022.
3. ADRIKO, M. *et al.* Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. **Acta Tropica**, 2014, v. 136, p. 50-57. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.001>>. Acesso em 5 fev 2022.
4. ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria. The Venezuelan experience. **Acta Tropica**, 2007. v. 103, n. 1, p. 41–49. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.04.018>>. Acesso em 10 mai 2022.
5. ANDRADE FILHO, J S *et al.* Ectopic cutaneous schistosomiasis: Report of two cases and a review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** [online]. 1998, v. 40, n. 4, p. 253-257. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46651998000400009>>. Acesso em 13 Nov 2021.
6. AUGUSTINE, D. L. & WELLER, T. H. Experimental studies on the specificity of skin tests for the diagnosis of schistosomiasis. **The Journal of Parasitology**, 1949, v. 35, n. 5, p. 461-466. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/3273648>>. Acesso em 13 Novembro de 2021.
7. BARBOSA CS *et al.* The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011 Nov, v. 106, n. 7, p. 878–83.

Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/mioc/a/7J4bvfg5kWPgQRfj4RrZyfS/?lang=en>>.

Acesso em 24 mai 2022.

8. BARBOSA et al, 2001 = BARBOSA CS et al. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2001, v. 17, n. 3, p. 725–8. [Internet]. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csp/a/96HscTdkHYsB3kvwz5DrHPw/?lang=pt>>. Acesso em 24 mai 2022.
9. BARBOSA, C S *et al*. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. **Revista de Saúde Pública** [online]. 2000, v. 34, n. 4, p. 337-341. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000400004>>. Acesso em 5 Nov 2021.
10. BARBOSA, C S *et al*. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 1998, v. 93, suppl 1, p. 265-266. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000700049>>. Acesso em 5 Nov 2021.
11. BARBOSA, C. S. *et al*. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 2006, v. 101, p. 55-62. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900009>>. Acesso em:
12. BARBOSA, C. S. *et al*. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2010, vol. 105, n. 4, p. 549-54. doi:10.1590/s0074-02762010000400034
13. BARBOSA, C. S., SILVA, C. B. e BARBOSA, F. S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Revista de Saúde Pública** [online]. 1996, v. 30, n. 6, p. 609-616. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89101996000600016>>. Acesso em 5 Nov 2021.
14. BARBOSA, C.S. *et al*. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. **Cadernos de Saúde Pública**, 2001, v. 17, n. 3, p. 725-728. Disponível em:

- <<https://www.scielo.br/j/csp/a/96HscTdkHYsB3kvwz5DrHPw/abstract/?lang=pt>>. Acesso em 5 Nov 2021.
15. BARENHOLD, O. *et al.* Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005953. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005953>. Acesso em: 13 out 2021.
 16. BLIGH 2010 = Bligh J, Schramm G, Chiodini PL, Doenhoff MJ. Serological analysis of the outcome of treatment of *Schistosoma mansoni* infections with praziquantel. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010; v. 104, n. 6, p. 511–20. Disponível em <<https://doi.org/10.1179/136485910X12786389891245> PMID: 20863440>. Acesso em 24 mai 2022.
 17. BLIGHT, J *et al.* Serological analysis of the outcome of treatment of *Schistosoma mansoni* infections with praziquantel. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 2010, v. 104, n. 6, p. 511-520. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/136485910X12786389891245>. Acesso em: 4 fev 2022.
 18. BOROS DL, WARREN KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Experimental Medicine*. 1970, v. 132, n. 3, p. 488-507. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/132/3/488/5939/DELAYED-HYPERSENSITIVITY-TYPE-GRANULOMA-FORMATION>>. Acesso em 03 Mar 2022.
 19. BRASIL, M. Da S. MANSONI Diretrizes Técnicas Diretrizes técnicas. [S.l.]: [s.n.], 2014. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2014. Vigilância da esquistossomose mansônica: diretrizes técnicas, 4a. ed. Ministério da Saúde, Brasília.
 20. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 30.
 21. BROOKER, S. *et al.* Rapid assessment of *Schistosoma mansoni*: the validity,

- applicability and cost-effectiveness of the lot quality assurance sampling method in Uganda. **Tropical Medicine & International Health**, 2005, v. 10, n. 7, p. 647-58. Disponível em <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01446.x>>. Acesso em 5 fev 2022.
22. BROWNE, H. G.; THOMAS, J. I. A method for isolating pure, viable schistosome eggs from host tissues. **The Journal of parasitology**, 1963. v. 49, n. 3, p. 371–374. Disponível em <<https://www.jstor.org/stable/3275800>>. Acesso em 03 Mar 2022.
23. BRUNET, L. R., et al. IL-4 protects against TNF- α -mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **Journal of Immunology**. v. 159, n. 2, p. 777–785 (1997). Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/159/2/777.long>>. Acesso em: 13 Novembro 2021.
24. CAI, P. et al. Comparison of Kato Katz, antibody-based ELISA and droplet digital PCR diagnosis of schistosomiasis japonica: Lessons learnt from a setting of low infection intensity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2019. v. 13, n. 3, p. 1–17. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/figure?id=10.1371/journal.pntd.0007228.g003>>. Acesso em 4 fev 2022.
25. CARNEIRO, TR *et al.* A conventional polymerase chain reaction-based method for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low-endemicity area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2013, v. 108, n. 8, p. 1037-1044. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-0276130202>>. Acesso em 2 jan 2022.
26. Carvalho AT, Martins Filho AO, Oliveira RC. A resposta imune na forma crônica da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, (editores). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20^a ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. p. 670-716.
27. CEREGHINO, G. P. L. *et al.* Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, 2012, v. 13, n. 4, p. 329–332. DOI: doi:10.1016/s0958-1669(02)00330-0
28. CHAMOT, E., TOSCANI, L., & ROUGEMONT, A.. Public health importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in Lake Lemán at Geneva, Switzerland. **Epidemiology and Infection**, 1998, v. 120, n.

- 3, p. 305-314. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/s0950268898008826>>. Acesso em 13 Novembro de 2021
29. CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, 2001. v. 34, n. 2, p. 273–282. Disponível em: <<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1053/jhep.2001.26376>>. Acesso em: 13 Novembro 2021.
30. CHIEFFI P.P.; KANAMURA, H. Diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansônica. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais**, 1978, v.30, p.77-97. Acesso em 06 Jan 2022.
31. COELHO PMZ, et al. 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.
32. COKER, C. M.; LICHTENBERG, F. A Revised Method for Isolation of *Schistosoma mansoni* Eggs for Biological Experimentation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1956. v. 92, n. 4, p. 780–782. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-92-22612>>. Acesso em 03 Mar 2022.
33. COLLEY, D. G., et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**. 2014, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264. Disponível em: <[doi:10.1016/s0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61949-2)> Acesso em: 30 mai 2022.
34. DA FROTA SM, et al. Combination of Kato-Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. **Acta Tropica**. 2011, n. 120, v. 1, p. S138-41. Disponível em <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001-706X\(10\)00168-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001-706X(10)00168-3)>. Acesso em 25 mai 2022.
35. DA FROTA, S. M., et al. Combination of Kato–Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. 2011, **Acta Tropica**, v. 120, p. S138–S141. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X10001683>>. Acesso

- em: 4 fev 2022.
36. DAMASCENO L, RITTER G, BATT CA. Process development for production and purification of the *Schistosoma mansoni* Sm14 antigen. **Protein Expression and Purification**, 2017, v. 134, p. 72-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.04.002>. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28389350.
 37. DAMIAN, R. T. et al. *Schistosoma mansoni* egg granuloma size reduction in challenged baboons after vaccination with irradiated cryopreserved schistosomula. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1984. v. 81, n. 11 I, p. 3552–3556.
 38. DE CLERQ, D. et al. Assessment of cure by detection of circulating antigens in serum and urine, following schistosomiasis mass treatment in two villages of the office du Niger, Mali. **Acta Tropica**. 1997, v. 68, n. 3 p. 339–346. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X97001113?via%3Dihub>>. Acesso em 5 fev 2022.
 39. DE JONGE, N. et al. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1991, v. 85, p. 756-759. Disponível em <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/85/6/756/1916574>>. Acesso em 03 Mar 2022.
 40. DEELDER, A. M. et al. Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infection by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Tropical and Geographical Medicine**, Amsterdam, 1994, v. 46, n. 4, p. 233-238. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7825226/>> . Acesso em 03 Mar 2022.
 41. DEMAINE, AL, VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, 2009. v. 27, n. 3, p. 297-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008. PMID: 19500547.
 42. DISCH, J. et al. Daily fluctuations of levels of circulating cathodic antigen in urine of children infected with *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1977, v. 91, n. 2, p. 222-5. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/91/2/222/1918194?redirected>

- [dFrom=fulltext&login=false](#)>. Acesso em 5 fev 2022.
43. DOENHOFF MJ, *et al.* Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** [Internet]. 1981, v. 75 n. 1, p. 41–53. Disponível em: doi:10.1016/0035-9203(81)90012-2. Acesso em 3 mar 2022.
 44. DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends in Parasitology**, 2004, Oxford, v. 20, p. 35-39.
 45. DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends in Parasitology**, 2004, Oxford, v. 20, p. 35-39. Disponível em <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492203002939>>. Acesso em 03 Mar 2022.
 46. DUNNE DW; COOK A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**. 2005, v. 5, n. 5, p. 420-6
 47. ENGVALL, E. and PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. **Immunochemistry**, 1971, v. 8, p. 871-874. Disponível em <[http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)>.
 48. ENK MJ, *et al.* The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropical**. 2008; v. 108, n. 2-3, p. 222-228. doi:10.1016/j.actatropica.2008.09.016
 49. ENK, M. J., *et al.* Factors related to transmission of and infection with *Schistosoma mansoni* in a village in the South-eastern Region of Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 2010, v. 105, n. 4, p. 570–577. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000400037>>. Acesso em 4 fev 2022.
 50. ESPÍRITO-SANTO MC, *et al.* Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni in Areas

- of Low Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. **BioMed Research International**, 2015, v. 2015, p. 135689. doi:10.1155/2015/135689
51. ESPÍRITO-SANTO, M. C. C., et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. **BMC Infectious Diseases**, 2014, v. 14, n. 558. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12879-014-0558-4>>.
 52. EVERTS, B. et al. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. **Journal of Experimental Medicine**, 2012. v. 209, n. 10, p. 1753–1767. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22966004/>>. Acesso em: 13 Novembro 2021
 53. FAVRE TC, et al. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1995, v. 90, p. 565–567. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000500004>>. Acesso em 06 Jan 2022.
 54. FERNÁNDEZ-SOTO P, et al. Molecular Markers for Detecting *Schistosoma* Species by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Disease Markers**. 2020, v. 2020, n. 8042705. Acesso em: <<https://www.hindawi.com/journals/dm/2020/8042705/>>. Acesso em 06 Jan 2022.
 55. FIGUEIREDO JP, et al. Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area. **Parasite Immunology**. 2012, v. 34, n. 12, p. 604-10. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pim.12001>>. Acesso em 10 mai 2022.
 56. FUJI, I. Katayama disease. **Katayamaki: Chugai Iji Shimpō**. 1984, v. 691, p. 55-56
 57. GANDASEGUI J, et al. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2018, v. 12, n. 3, p. e0006314. Disponível em; <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006314>>. Acesso em 06 Jan 2022.

58. GANDASEGUI J, *et al.* BiomphaLAMP: a new rapid loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* snail host. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2016, v. 10, n. 12, p. e0005225. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005225>>. Acesso em 06 Jan 2022.
59. GARCÍA-BERNALT, J. D., *et al.* Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test. **Scientific Reports**. 2019, v. 9, n. 1, p. 14744. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51342-2>>. Acesso em 06 Jan 2022.
60. GOMES, ECS *et al.* Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 2016, v. 19, n. 04. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/1980-5497201600040012>>. Acesso em 5 Nov 2021.
61. GOMES, ECS *et al.* Urban schistosomiasis: An ecological study describing a new challenge to the control of this neglected tropical disease. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 8, p. 1-16, 2021. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X\(21\)00140-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X(21)00140-X/fulltext)>. Acesso em 05 jun 2022.
62. GOMES, ECS, *et al.* Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco--Brazil. *International Journal of Health Geographics*. 2012, v. 11, n. 51. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23164247/>>. Acesso em 5 Nov 2021.
63. GOMES, ECS. Case report first record of prostatic schistosomiasis in Pernambuco, Brazil: Signs of chronicity in an endemic disease. **Revista de Patologia Tropical**. 2016, v. 45, n.1, p. 132-138. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v45i1.40095>>. Acesso em 13 nov 2021.
64. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, 2003, v. 3, n. 1, p. 23–35. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.009>>. Acesso em: 13 Novembro 2021.
65. GRENFELL, R. F. Q. *et al.* *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: The importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2013. v. 108, n. 3, p. 328–334.

- Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/mioc/a/HMX4MxcQKjppqYdCR5s3s7p/abstract/?lang=en>. Acesso em: 4 fev 2022.
66. GRYSEELS, B. Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2012, v. 26, n. 2, p. 383–397.
67. GRYSEELS, B., *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**, 2006, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736\(13\)](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736(13)). Acesso em 11 Nov 2021.
68. GUEGAN, H., *et al.* Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, v. 13, n. 9, p. e0007711. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007711>>. Acesso em 2 jan 2022.
69. HAMS E; AVIELLO G, FALLON PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers of Immunology**. 2013, v. 4, p. 89. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23596444/>>. Acesso em 30 jun 2022.
70. HASSAN, M.N.; BADAWI, M.A.; STRAND, M. Circulating schistosomal antigen in diagnosis and assessment of cure in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1992, v. 46, p. 737-744. Disponível em <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tjpmh/46/6/article-p737.xml>>. Acesso em 03 Mar 2022.
71. HENKLE, K. J. *et al.* Comparison of the cloned genes of the 26- and 28-kilodalton glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1990. v. 40, n. 1, p. 23–34. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90076-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90076-X)
72. HESSE, M., *et al.* NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **American Journal of Pathology**. 2000, v. 157, n. 3, p. 945–55. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64607-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64607-x)>. Acesso em: 13 Novembro 2021.
73. HINZ, R. *et al.* Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis – A review. *Molecular and Cellular Probes*, 2017. v. 31, p. 2–21. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850816301190?via%3Dihub>>. Acesso em 4 fev 2022.

74. HOCKLEY DJ. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Advances in Parasitology**, 1973, v. 11, n. 0, p. 233-305. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065308X08601888?via%3Dihub>>. Acesso em 5 fev 2022.
75. HOFFMANN, K. F., CHEEVER, A. W., WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**. 2000, v. 164, p. 6406–6416. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6406>>. Acesso em: 13 Novembro 2021.
76. HOGG, K. G., *et al.* Interleukin-12 p40 Secretion by Cutaneous CD11c+ and F4/80+ Cells Is a Major Feature of the Innate Immune Response in Mice That Develop Th1-Mediated Protective Immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, 2003, v. 71, n. 6, p. 3563–3571. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/iai.71.6.3563-3571.2003>>. Acesso em 13 Novembro de 2021.
77. HOTEZ, P. J. *et al.* The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2553488/>>. Acesso em 22 mai 2022.
78. IGREJA, R. P. *et al.* *Schistosoma mansoni*-related morbidity in a low-prevalence area of Brazil: A comparison between egg excretors and seropositive non-excretors. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 2007. v. 101, n. 7, p. 575–584. Disponível em <<https://doi.org/10.1179/136485907x229086>>. Acesso em 10 mai 2022.
79. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte: CPqRR, 2018.
80. JANNOTTI-PASSOS LK, *et al.* Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae). **Journal of Parasitology**. 2006, v. 92, p. 401–403. Disponível em: <<https://doi.org/10.1645/GE593R1.1>>. Acesso em 06 Jan 2022.

81. JESUS, A. R. DE et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infection and Immunity**, 2004. v. 72, n. 6, p. 3391–3397. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15155645/>> . Acesso em: 13 Novembro 2021.
82. KARBALEEI M, REZAEE SA, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cell Physiol.** 2020, v. 235, n. 9, p. 5867–5881. doi: 10.1002/jcp.29583. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32057111; PMCID: PMC7228273.
83. KATO K, et al. Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *Journal of Biochemistry*, 1977, v. 82, n. 1, p. 261–6.
84. KATZ, N. Brazilian contributions to epidemiological aspects of schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 1992, v. 87, p. 1-9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000800001>>. Acesso em 30 mai 2022.
85. KATZ, N., CHAVES A., & PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1972, v. 14, n. 6, p. 397–400. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4675644/>>. Acesso em: 17 Dezembro 2021.
86. KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 2003, v. 55, n. 1. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00096725200300010002>. Acesso em 30 mai 2022.
87. KOURILOVA, P., et al. Cercarial Dermatitis Caused by Bird Schistosomes Comprises Both Immediate and Late Phase Cutaneous Hypersensitivity Reactions. **The Journal of Immunology**, 2004, v. 172, n. 6, p. 3766–3774. Disponível em: <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3766>>. Acesso em 13 Novembro de 2021.
88. LAMBERTUCCI, J R et al. Genital schistosomiasis mansoni: tubal tumor and parietal peritoneum involvement diagnosed during laparoscopy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** [online]. 2009, v. 42, n. 5, p.

- 583-586. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/PfJbzW7YCx5KrBL8QzDcTKr/abstract/?lang=pt&format=html>. Acesso em 13 Nov 2021.
89. LINDSTROM P, WAGER O. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1978, v. 7, n. 5, p. 419–25. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3083.1978.tb00472.x>.
90. MAHMOUD, AAF. Esquistossomose e outras infecções por trematódeos. In: Braunwald E, Kasper DL, Fauci AS, et al. (editores). Harrison medicina interna. 17^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2009, p. 1330-5.
91. MARCHIORI, C.H. Primeira ocorrência de *Biomphalaria straminea* no sul goiano, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 1999, v. 33, n. 6, p. 622-623. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101999000600014>. Acesso em 30 mai 2022.
92. MESQUITA, SG, *et al.* A loop-mediated isothermal amplification assay for *Schistosoma mansoni* detection in *Biomphalaria* spp. from schistosomiasis-endemic areas in Minas Gerais, Brazil. **Parasites & Vectors**. 2021, v. 14, n. 1, p. 388. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04888-y>. Acesso em 06 Jan 2022.
93. MITASHI, P., *et al.* Diagnostic accuracy of loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2013, v. 7, n. 10, p. e2504. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002504>. Acesso em 06 Jan 2022
94. MOHAMMED ES *et al.* Dynamics of serological responses to defined recombinant proteins during *Schistosoma mansoni* infection in mice before and after the treatment with praziquantel. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2020, v. 14, n. 9, p. e0008518. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008518>. Acesso em 24 mai 2022.
95. MONTENEGRO, S. M. *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the crossregulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **Journal of Infect Diseases**. 1999, v. 179, n. 6, p. 1502–1514. Disponível em: <>. Acesso em: 13 Novembro 2021.

96. MORGAN, J. A. T., *et al.* Schistosoma mansoni and Biomphalaria: past history and future trends. **Parasitology**. 2001, v. 123, n. 07. doi:10.1017/s0031182001007703. Acesso em 30 mai 2022.
97. MWANGI IN, *et al.* Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Schistosoma mansoni Infection in Faecal Samples. **Journal of Parasitology Research**. 2018, v. 2018, n. 1267826. Disponível em: <>. Acesso em 06 Jan 2022.
98. NEGRÃO-CORRÊA, D, *et al.* Association of Schistosoma mansoni-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88042, 2014. Disponível em <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088042#references>>. Acesso em 24 mai 2022.
99. NEVES J, CUNHA AS. Esquistossomose Mansonii. In: Neves J, (editor). **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1978. p. 567-78.
100. NOTOMI T, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **Journal of Microbiology**. 2015, v. 53, n. 1, p. 1-5. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25557475/>>. Acesso em: 06 Jan 2022.
101. NOTOMI, T. *et al.* Loopmediated isothermal amplification of DNA. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**. 2000, v. 28, n. 12, p. E63. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>>. Acesso em: 06 Jan 2022.
102. NOYA, O *et al.* Schistosomiasis in America. **Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean**, v. , p. 11–43, 2015. doi:10.1007/978-3-7091-1422-3_2
103. NUNN, J. F., & TAPP, E. Tropical diseases in Ancient Egypt. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2000, v. 94, n. 2, p. 147–153. Disponível em: <doi:10.1016/s0035-9203(00)90252-9> Acesso em 30 mai 2022.
104. OLIVEIRA, E. J. DE; KANAMURA, H. Y.; CORREIA LIMA, D. M. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Memórias do**

- Instituto Oswaldo Cruz**, 2005. v. 100, n. 4, p. 421–425. Disponível em: <<https://memorias.ioc.fiocruz.br/article/1857/efficacy-of-an-enzyme-linked-immunosorbent-assay-as-a-diagnostic-tool-for-schistosomiasis-mansoni-in-individuals-with-low-worm-burden>>. Acesso em: 4 fev 2022.
105. OLIVEIRA, L. M. A. *et al* Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2010, v. 68, n. 4, p. 416–421. Disponível em: <10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.016>.
 106. OLIVER-GONZÁLEZ, J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Infectious Diseases**, 1994. v. 95, n. 1, p. 86–91. Disponível em <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/95.1.86>>. Acesso em 03 Mar 2022.
 107. PATTON, E. A. *et al*. Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. **Infection and Immunity**, 2002. v. 70, n. 1, p. 177–184.
 108. PONTES LA, DIAS-NETO E, RABELLO A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and faeces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, v. 66, p. 157-162.
 109. PURI, M., *et al*. Rapid diagnosis of *Leishmania* infection with a portable loop mediated isothermal amplification device. **Journal of Biosciences**. 2021, v. 46, n. 4, p. 92. doi: 10.1007/s12038-021-00211-0. PMID: 34635627; Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12038-021-00211-0>>. Acesso em 06 Jan 2022.
 110. QIAN, Z.L.; DEELDER, A.M. Circulating antigens in *Schistosoma*-infections. **Acta Leidensia**, v. 49, p. 71-80, 1982. Acesso em 03 Mar 2022.
 111. REY, L. *Parasitologia* 3ª. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001.
 112. REY, L. *Parasitologia* Xª. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2008.
 113. RICHARDS, F.O. *et al*. Integration of mass drug administration programmed in Nigeria: the challenge of schistosomiasis. **Bulletin of the**

- World Health Organization**, 2006, v. 84, n. 8, p. 673-6. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/269701>. Acesso em 5 fev 2022.
114. RIPERT, C. *et al.* Detection with a monoclonal antibody of an antigen characteristic of the genus *Schistosoma* excreted in the urine. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 39, p. 131-135, 1988. Acesso em 03 Mar 2022.
 115. ROSS, A. G., *et al.* Katayama syndrome. **The Lancet Infectious Diseases**, 2007, v. 7, n. 3, p. 218–224. Disponível em: 10.1016/s1473-3099(07)70053-1. Acesso em 11 Nov 2021.
 116. SARHAN, R. M. *et al.* Comparative analysis of the diagnostic performance of adult, cercarial and egg antigens assessed by ELISA, in the diagnosis of chronic human *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology Research**, 2014, v. 113, n. 9, p. 3467–3476. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-014-4017-3>>. Acesso em: 4 fev 2022.
 117. SCHAECHTER, M; View From Here Group. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the view from here. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 2001. v. 65, n. 1, p. 119-130. doi:10.1128/MMBR.65.1.119-130.2001
 118. SHER A *et al.* Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *Journal of Immunol.* 1991, v. 147, n. 8, p. 2713-6. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1680917/>>. Acesso em 17 jul 2022.
 119. SILVA DA PAZ, W., *et al.* Population-based, spatiotemporal modeling of social risk factors and mortality from schistosomiasis in Brazil between 1999 and 2018. **Acta Tropica**, 2021, v. 218, n. 105897. Disponível em: <doi:10.1016/j.actatropica.2021.105897>. Acesso em 14 mai 2022.
 120. SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiologia Serv. Saúde, Brasília** , v. 20, n. 3, p. 327-336, set. 2011 . Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742011000300007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 05 nov. 2021.
 121. SILVA-MORAES, V. *et al.* Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas?. **Memórias do Instituto**

- Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180478, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/Mz5Vv84MVZytnFwHSRS9c6z/?lang=en#>>. Acesso em: 13 out 2021.
122. SILVEIRA AM, *et al.* High levels IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigen in individuals with periportal fibrosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 5, p. 542–549, 2002. Disponível em <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/66/5/article-p542.xml>>. Acesso em 24 mai 2022.
123. SIQUEIRA LMV *et al.* Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 2011, v. 106, n. 7, p. 844-850. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000700010>>. Acesso em 17 Dez 2021.
124. SIQUEIRA, LMV *et al.* Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 2015, v. 110, n. 2, p. 209-214. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0074-02760140375>>. Acesso em 2 Jan 2022]
125. SMITHERS, S. R. The isolation of viable schistosome eggs by a digestion technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1960. v. 54, n. 1, p. 68–70. Disponível <<https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/54/1/68/1902836?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em 03 Mar 2022.
126. SOUZA CP, LIMA, LC. 1990. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. 2ª ed. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz; 79 p. (Série Esquistossomose, 1).
127. SOUZA, F. P. C. De *et al.* Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history: [review]. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, 2011. v. 9, n. 4, p. 300–307. Disponível em: It;<<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=594912&indexSearch=ID>>>. Acesso em 13 Novembro

- 2021.
128. TENDLER, M. *et al.* A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1996, v. 93, n. 1, p. 269-273. DOI: <https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.93.1.269>
 129. TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006. v. 72, n. 2, p. 211-22. doi: 10.1007/s00253-006-0465-8.
 130. TONELLI, E. Fase aguda da esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1972. v. 6, n. 5, p. 299–308.
 131. UTZINGER, J., *et al* New diagnostic tools in schistosomiasis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2015, v. 21, n. 6, p. 529–542. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.03.014>>. Acesso em 17 Dezembro 2021.
 132. VANWEEMEN BK, SCHUURS AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **FEBS Letters**. 1971, v. 15, n. 3, p. 232–6.
 133. VAN LIESHOUT, L. *et al.* Circulating cathodic antigen levels in serum and urine of schistosomiasis patients before and after chemotherapy with praziquantel. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1993, v. 87, n. 3, p. 311-312. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90142-d](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90142-d)>. Acesso em 5 fev 2022.
 134. VAN LIESHOUT, L. *et al.* Monitoring the efficacy of different doses of praziquantel by quantification of circulating antigens in serum and urine of schistosomiasis patients. **Parasitology**, 1994, v. 108 (Pt 5), p. 519-26. Disponível em <<https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/monitoring-the-efficacy-of-different-doses-of-praziquantel-by-quantification-of-circulating-antigens-in-serum-and-urine-of-schistosomiasis-patients/1DE35160A8746C2ACAF8E7C612A9FA99>>. Acesso em 5 fev 2022.
 135. VAN'T WOUT, A, B. *et al.* Schistosome circulating anodic antigen in serum of individuals infected with *Schistosoma japonicum* from the Philippines before

- and after chemotherapy with praziquantel. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1992, v. 86, n. 4, p. 410-413. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90243-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90243-6)>. Acesso em 5 fev 2022.
136. VENDRAME, C M *et al.* Evaluation of anti-Schistosoma mansoni IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 43, n. 3, p. 153-159, 2001. Disponível em: doi:10.1590/s0036-46652001000300007. Acesso em: 13 de out 2021.
 137. VIDAL, C H F *et al.* Epidemiological aspects in neuroschistosomiasis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** [online]. 2010, v. 68, n. 1, p. 72-75. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0004-282X2010000100016>>. Acesso em 13 nov 2021.
 138. VOLLER, A. *et al.* Enzyme immunoassays for parasitic diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1976, v. 7, n. 2, p. 98-106. Disponível em <<https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/70/2/98/1916204?redirectedFrom=fulltext&login=false>>.
 139. WEERAKOON, K. G. A. D., *et al.* Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2015, v. 28, n. 4, p. 939–967. Disponível em <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00137-14#tab-citations>>. Acesso em 10 jul 2022.
 140. WHO. Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control. Schistosomiasis and Intestinal Parasites Control. **World Health Organization**, Geneva. 1998. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/65978>>. Acesso em 22 mai 2022.
 141. WHO. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2016. **The Weekly Epidemiological Record**, 2017; v. 91, n. 5, p. 53-60. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9105>>. Acesso em 11 jun 2022.
 142. World Health Organization. Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis: Report of a WHO Expert Committee. **WHO**

Technical Report Series, 2002. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42588>>. Acesso em 22 mai 2022.

143. World Health Organization. WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control. **Schistosomiasis and Intestinal Parasites Control**. Genebra, 1998, p. 2-4. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65978>. Acesso em: 11 jun. 2022.
144. YORDE DE, *et al.* Competitive enzyme linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. **Clinical Chemistry**. 1976, v. 22, p. 1372–7.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da IAM

Portal do Governo Brasileiro

 **Plataforma Brasil**

[Esqueceu a senha?](#) [Cadastre-se](#) v3.2

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: IMUNODIAGNÓSTICO PARA ESQUISTOSSOMOSE: SELEÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS E DESENVOLVIMENTO DE KIT PARA APLICAÇÃO EM ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE
Pesquisador Responsável: Constança Clara Gayoso Simões Barbosa
Contato Público: Constança Clara Gayoso Simões Barbosa
Condições de saúde ou problemas estudados:
Descritores CID - Gerais:
Descritores CID - Específicos:
Descritores CID - da Intervenção:
Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 13/11/2019



DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Cidade: RECIFE

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5190 - Instituto Aggeu Magalhães (IAM)
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Telefone: (81)2101-2639
E-mail: cep.iam@iocruz.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

Suporte a sistemas: 136 - opção 8 e opção 3, solicitar ao atendente suporte Plataforma Brasil.
Fale conosco: [Clique para enviar mensagem para a Plataforma Brasil](#)



MINISTÉRIO DA
SAÚDE



ANEXO B

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Experimentação animal (CEUA):



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**Manutenção de cepas de Schistosoma mansoni para pesquisas científicas**” protocolado sob nº **123/2017** pelo (a) pesquisador (a) **Constança Simões Barbosa** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 22 de março de 2022 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogêneo (Swiss Webster)	2.880 (30-40gr/ 7-8 semanas/ machos e fêmeas)
Total	2880

Recife (PE, Brasil), 22 de março de 2018

Dra Edileuza Felinto de Brito
Vice-Coordenadora CEUA/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE
Mat. Slape 0464741
E-mail: britomef@cpqam.fiocruz.br

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o professor da Área Acadêmica de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas – CCM, UFPE, Dr. **Wheverton Ricardo Correia do Nascimento**, SIAPE: **2858463** e CPF: **014.268.704-93** atua como pesquisador colaborador do laboratório do Serviço de Referência em Esquistossomose SRE; atua na gerência da qualidade do SRE; e participa do grupo de pesquisa “**Epidemiologia e Controle de Endemias**”, tendo, portanto, acesso às instalações físicas e recursos do laboratório do qual sou coordenadora.

Atenciosamente,

Recife, 27 de setembro de 2021



Dr.ª Constança Clara Gayoso Simões Barbosa

Coordenadora do Laboratório de Referência em Esquistossomose
Pesquisadora em Saúde Pública - IAM/ Fiocruz/ PE
Departamento de Parasitologia



Constança Simões Barbosa
Pesquisadora Titular - PhD Saúde Pública
Coord. Laboratório e Serviço de Referência
em Esquistossomose