



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

NATÁLIA ADRIELY RIBEIRO DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE TÉCNICAS
MOLECULARES BASEADAS EM LAMP PARA O
DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Recife
2023

NATÁLIA ADRIELY RIBEIRO DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE TÉCNICAS
MOLECULARES BASEADAS EM LAMP PARA O
DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

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.

Orientadora: Elaine Christine de Souza Gomes

Coorientador: Walter Lins Barbosa Júnior

Recife
2023

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

Costa, Natália Adriely Ribeiro da Silva.

Avaliação da sensibilidade de técnicas moleculares baseadas em LAMP para o diagnóstico da Esquistossomose mansônica / Natália Adriely Ribeiro da Silva Costa. - Recife, 2023.

63 : il.

Orientador(a): Elaine Christine de Souza Gomes

Coorientador(a): Walter Lins Barbosa Junior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. LAMP. 2. Esquistossomose. 3. PCR. 4. Kato-Katz. 5. Kit Diagnóstico. I. Gomes, Elaine Christine de Souza. (Orientação). II. Barbosa Junior, Walter Lins. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

NATÁLIA ADRIELY RIBEIRO DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE TÉCNICAS
MOLECULARES BASEADAS EM LAMP PARA O
DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

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

Orientadora: Dra. Elaine Christine de Souza Gomes
Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz PE/ Departamento de Parasitologia

Dr. Fábio Lopes de Melo
Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz PE/ Departamento de Parasitologia

Prof. Dr. André de Lima Aires
UFPE/ Departamento de Medicina Tropical

Dedico este trabalho a minha Família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por nunca me abandonar, ter fé me ajudou desde pequena a entender a vida e meus sonhos. Também foi essa fé que me ensinou que com amor, empatia e muito esforço eu alcançarei todos os meus sonhos.

Agradeço a minha mãe, Emilia, e meu pai, Adriano, por tudo que fizeram por mim, mesmo com todas as dificuldades que passamos, sempre me ensinaram a sonhar. Também foram eles que me ensinaram que, com o estudo, eu serei capaz de alcanças todos os meus sonhos e que a Educação é o melhor caminho que posso seguir. Agradeço ao meu irmão, Victor, por estar sempre comigo, por investir nos meus estudos e por trazer alegria no meu dia-a-dia com suas brincadeiras. Agradeço a minha prima, Jéssica, por acreditar em mim, por me levar para acompanha-la em tantos passeios e por todos os cuidados com meu cabelo que me ajudaram a fortalecer minha autoestima.

Agradeço aos amigos maravilhosos que a vida me trouxe, Irene, Lidiane e Emannoel, obrigada pelos 10 anos de amizade, por todo apoio, pelas risadas, pelos conselhos que me ajudaram a ser uma pessoa melhor, são uma família para mim.

Agradeço ao meu namorado, Matheus, por abrir meu coração para o amor, por seu companheirismo e por todo carinho que traz para minha vida.

Agradeço aos meus cachorros, Marley, Fiona, Bilu e Aladim por toda alegria e amor que me trazem todos os dias. Agradeço aos meus gatinhos, Floquinho e Marie, que moram no meu coração e para sempre vou carrega-los comigo, obrigado por todo amor que me mostraram no tempo curto que viveram comigo.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Elaine, por todo conhecimento científico e de vida que me passou, obrigada por me guiar pela minha vida acadêmica. Agradeço ao meu co-orientador, Walter, por me ensinar com tanta paciência e por me ajudar sempre que tenho dúvidas. Agradeço a todos os meus amigos do Laboratório de Referência em Esquistossomose, por fazerem todos os dias mais alegres com sua presença e por toda a ajuda durante a iniciação científica.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a chegar até aqui e que contribuíram para minha formação como Biomédica.

Dentro do nada existe um potencial infinito
- Shunmyo Masuno

COSTA, Natália Adriely Ribeiro da Silva. **Avaliação da Sensibilidade de Técnicas Moleculares Baseadas em LAMP para o Diagnóstico da Esquistossomose Mansônica**. 2023. 63. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A Esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*. O Kato-Katz, método de diagnóstico recomendado pelo ministério da saúde, apresenta uma baixa sensibilidade para as pessoas que possuem baixa carga parasitária. Assim, alternativas moleculares para o diagnóstico da doença podem ser utilizadas, visto que apresentam uma maior sensibilidade. O LAMP é um teste rápido, econômico, sensível e específico; ademais, pode ser adaptado para uso em campo na forma de kit diagnóstico, o que facilita mais o diagnóstico. Para isso, os reagentes precisam ter uma boa estabilidade ao longo do tempo e seu manuseio deverá ser minimizado para evitar contaminações, o que pode ser realizado por meio da liofilização dos reagentes. O trabalho apresentou como objetivos a avaliação da sensibilidade das técnicas SmMIT-LAMP e SmITS-LAMP com reagentes previamente liofilizados e a determinação da estabilidade dos reagentes não liofilizados ao longo do tempo. Para a avaliação da sensibilidade das técnicas LAMP, foram preparados dois Master Mix para a liofilização. O Sistema 1 foi preparado com todos os reagentes e o Sistema 2 foi preparado sem Betaína e enzima Bst 2.0 WarmStart®, as quais só foram adicionadas no momento do experimento do LAMP. Os sistemas SmMIT-LAMP e SmITS-LAMP foram liofilizados no liofilizador e, após isso, foram avaliados por meio de uma curva de sensibilidade analítica. Ademais, o SmITS-LAMP não liofilizado foi avaliado também por meio de uma curva de sensibilidade analítica em duas situações, geladeira a 4 °C e freezer a -25°C, em 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias. Na avaliação dos sistemas liofilizados, apenas o sistema 1 do SmITS-LAMP apresentou amplificação, com uma sensibilidade de 1 ng e o SmITS-LAMP ao longo do tempo apresentou estabilidade até 90 dias para o Sistema 1, armazenado no freezer, com uma sensibilidade de 1 pg. Com isso, conclui-se que a diminuição da sensibilidade do sistema liofilizado ocorreu devido à liofilização, sendo necessárias novas etapas de otimização do SmITS-LAMP para aumentar seu desempenho, o que pode auxiliar no desenvolvimento de um kit diagnóstico.

Palavras-chave: LAMP. Esquistossomose. PCR. Kato-Katz. Kit diagnóstico.

COSTA, Natália Adriely Ribeiro da Silva. **Evaluation of the Sensitivity of LAMP-Based Molecular Techniques for the Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni.** 2023. 63. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by the parasite *Schistosoma mansoni*. The Kato-Katz, the diagnostic method recommended by the Ministry of Health, has a low sensitivity for people who have a low parasitic load. Thus, molecular alternatives for the diagnosis of the disease can be used, since they have greater sensitivity. LAMP is a quick, economical, sensitive and specific test; moreover, it can be adapted for use in the field in the form of a diagnostic kit, which makes diagnosis even easier. For this, the reagents need to have good stability over time and their handling should be minimized to avoid contamination, which can be done by lyophilizing the reagents. The objective of this work was to evaluate the sensitivity of the SmMIT-LAMP and SmITS-LAMP techniques with previously lyophilized reagents and to determine the stability of non-lyophilized reagents over time. To evaluate the sensitivity of the LAMP techniques, two Master Mixes were prepared for lyophilization. System 1 was prepared with all reagents and System 2 was prepared without Betaine and Bst 2.0 WarmStart® enzyme, which were only added at the time of the LAMP experiment. The SmMIT-LAMP and SmITS-LAMP systems were lyophilized in the lyophilizer and, after that, they were evaluated using an analytical sensitivity curve. Furthermore, the non-lyophilized SmITS-LAMP was also evaluated using an analytical sensitivity curve in two situations, a refrigerator at 4°C and a freezer at -25°C, at 0, 15, 30, 60, 90 and 180 days. In the evaluation of the lyophilized systems, only the SmITS-LAMP system 1 showed amplification, with a sensitivity of 1 ng and the SmITS-LAMP over time showed stability up to 90 days for System 1, stored in the freezer, with a sensitivity of 1 pg. With this, it is concluded that the decrease in the sensitivity of the lyophilized system occurred due to lyophilization, requiring new optimization steps of the SmITS-LAMP to increase its performance, which can help in the development of a diagnostic kit.

Key words: LAMP. Schistosomiasis. PCR. Kato-Katz. Diagnostic kit.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição mundial da esquistossomose	14
Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no Brasil	14
Figura 3 – Distribuição da esquistossomose em Pernambuco	15
Figura 4 – Ciclo de infecção da esquistossomose	16
Figura 5 – Caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i>	17
Figura 6 – Distribuição dos hospedeiros intermediários da esquistossomose no Brasil, (A) <i>Biomphalaria glabrata</i> , (B) <i>Biomphalaria straminea</i> e (C) <i>Biomphalaria tenagophila</i> .	18
Figura 7 – Técnica parasitológica Kato-Katz	19
Figura 8 – Amplificação realizada na técnica de LAMP	23
Figura 9 – Experimentos realizados com o LAMP Liofilizado	28
Figura 10 – Curva de sensibilidade analítica detectada por meio do SmMIT-LAMP (100pg), a partir da extração de DNA de <i>Schistosoma mansoni</i> . Controle negativo representado por CN	31
Figura 11 – Curva de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP (10fg), a partir da extração de DNA de <i>Schistosoma mansoni</i> . Controle negativo representado por CN.	31
Figura 12 – Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP, para o S1 (Com betaína e enzima) e S2 (Sem betaína e enzima) a partir da extração de DNA de <i>Schistosoma mansoni</i> . Controle negativo representado por CN.	32
Figura 13 – Resultados da sensibilidade do S1 e S2 sob luz UV	32
Figura 14 – Resultado aproximado da sensibilidade do S1 na concentração de 1 ng.	32
Figura 15 – Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP com liofilização dos reagentes no tubo de 1,5 mL, para o S1 (Com betaína e enzima) e S2 (Sem betaína e enzima) a partir da extração de DNA de <i>Schistosoma mansoni</i> . Controle negativo representado por CN.	33
Figura 16 – (A) Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP com liofilização dos reagentes no tubo de 200 µL, para o S1 (Com betaína e enzima) e S2 (Sem betaína e enzima) a partir da extração de DNA de <i>Schistosoma mansoni</i> . Controle negativo representado por CN. (B) E o Mesmo resultado na luz UV	34

Figura 17 – (A) Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP com liofilização dos reagentes no tubo de 200 µL, para o S1 (Com betaína e enzima). Controle negativo representado por CN. (B) E o Mesmo resultado na luz UV

34

Figura 18 – SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2) armazenado em geladeira e congelador no Tempo 0. Apresentou sensibilidade de 1 fg para S1 armazenado em geladeira.

35

Figura 19 – SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2) armazenado em geladeira e congelador no Tempo 15 dias. Apresentou sensibilidade de 100 fg para S1 armazenado em congelador

36

Figura 20 – SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2) armazenado em geladeira e congelador no Tempo 30 dias. Apresentou sensibilidade de 100 fg para S2 armazenado em geladeira

36

Figura 21 – SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2) armazenado em geladeira e congelador no Tempo 60 dias. Apresentou sensibilidade de 100 fg para S2 armazenado em geladeira e para o S1 armazenado em congelador.

37

Figura 22 – SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2) armazenado em geladeira e congelador no Tempo 90 dias. Apresentou sensibilidade de 1 pg para o S1 armazenado em congelador

37

Figura 23 – SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2) armazenado em geladeira e congelador no Tempo 180 dias. Nenhuma das condições manteve um bom padrão de sensibilidade.

38

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1	EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE	13
1.1.1	Distribuição da Doença	13
1.1.2	Agente Etiológico e Ciclo	15
1.1.3	Hospedeiro Intermediário	17
1.1.4	Fisiopatologia	18
1.2	DIAGNÓSTICO	19
1.2.1	Parasitológico	19
1.2.2	Imunológico	20
1.2.3	Molecular	21
2	OBJETIVOS	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	EXTRAÇÃO DE DNA	26
3.2	CURVA DE SENSIBILIDADE	27
3.3	SISTEMAS LAMP LIOFILIZADOS	27
3.3.1	Protocolo SmITS-LAMP-L	28
3.3.2	Protocolo SmMIT-LAMP-L	29
3.4	ESTABILIDADE AO LONGO DO TEMPO SMITS-LAMP	30
3.4	REVELAÇÃO DOS RESULTADOS LAMP	30
4	RESULTADOS	31
4.1	CURVA DE SENSIBILIDADE PARA O SMMIT-LAMP E SMITS-LAMP ANTES DA LIOFILIZAÇÃO	31
4.2	SMITS-LAMP LIOFILIZADO 1 COM 25 µL	31
4.3	SMITS-LAMP LIOFILIZADO 2 COM MASTER MIX DE 50 µL EM MICROTUBOS DE 200 µL E 1,5 ML	33
4.4	SMITS-LAMP LIOFILIZADO 3 EM DUPLICATA	34
4.5	ESTABILIDADE DO MIX AO LONGO DO TEMPO	34

5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	56
	ANEXO A – Parecer circunstanciado CEP	57

1 Introdução

A Esquistossomose é uma doença tropical negligenciada parasitária que acomete mais de 252 milhões de pessoas no mundo (SILVA-MORAES et al., 2019). É uma doença causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, cuja espécie causadora da doença no Brasil é *Schistosoma mansoni*, que tem como principal hospedeiro intermediário caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (CALASANS et al., 2018).

A ocorrência e a disseminação da esquistossomose estão relacionadas às condições ambientais precárias e condições socioeconômicas desfavoráveis, além do saneamento básico precário. Ademais, a ausência de água tratada para tomar banho, beber ou lavar roupas e utensílios da casa, além de hábitos culturais humanos contribuem para a persistência do ciclo de vida do parasito e para a disseminação da doença (CALASANS et al., 2018; HOTEZ, 2017; PAREDES et al., 2010; STEINMANN et al., 2006).

Para o diagnóstico da esquistossomose, o método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o Kato-Katz. Entretanto, apresenta baixa sensibilidade quando se trata de infecções com baixa carga parasitária (BERHE et al., 2004; WHO, 2002). Para superar essa problemática, outras formas de diagnóstico são realizadas e amplamente estudadas nas áreas de imunologia e biologia molecular (SILVA- MORAES et al., 2019).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de diagnóstico molecular considerada mais eficiente que o Kato-Katz, quando são consideradas baixas cargas parasitárias, pois detecta com alta sensibilidade e especificidade o DNA em diversas amostras biológicas (PONTES, 2002). Apesar das vantagens, não é muito utilizada em países de baixa renda, devido a necessidade de pessoal qualificado e equipamentos caros (FERNANDEZ-SOTO et al., 2014).

Uma alternativa à PCR é a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), que consiste em uma reação em condições isotérmicas, o que a torna mais rápida que a PCR. Em adição, apresenta uma maior especificidade e sensibilidade, pois utiliza dois *primers* internos e dois *primers* externos na reação, sendo assim, mais simples, econômico e facilmente adaptável a condições de campo (NOTOMI, 2000; LABARRE et al., 2011).

A conservação dos reagentes utilizados no LAMP representa uma limitação

significante nas atividades em campo, pois estes precisam ser manipulados para a produção do Master Mix, o que pode gerar contaminações nas reações. Desse modo, a liofilização dos reagentes é uma prática que pode minimizar a manipulação desses reagentes. Com isso, torna-se possível a minimização dos riscos de contaminação da reação, facilitando o uso do método para o diagnóstico de rotina (GARCÍA-BERNALT et al., 2019).

Ademais, outro modo de facilitar a aplicação do teste molecular é utilizá-lo no formato de kit diagnóstico. Para isso, é necessário que seus reagentes se mantenham estáveis a longo prazo. Contudo, para determinar seu “tempo de prateleira”, são necessárias pesquisas para definir o tempo e a melhor forma de armazenar esses reagentes (MARUSHCHAK et al., 2020).

Logo, o trabalho foi realizado para avaliar se o LAMP pode ser utilizado como uma alternativa diagnóstica mais sensível e rápida de ser utilizada em condições de campo.

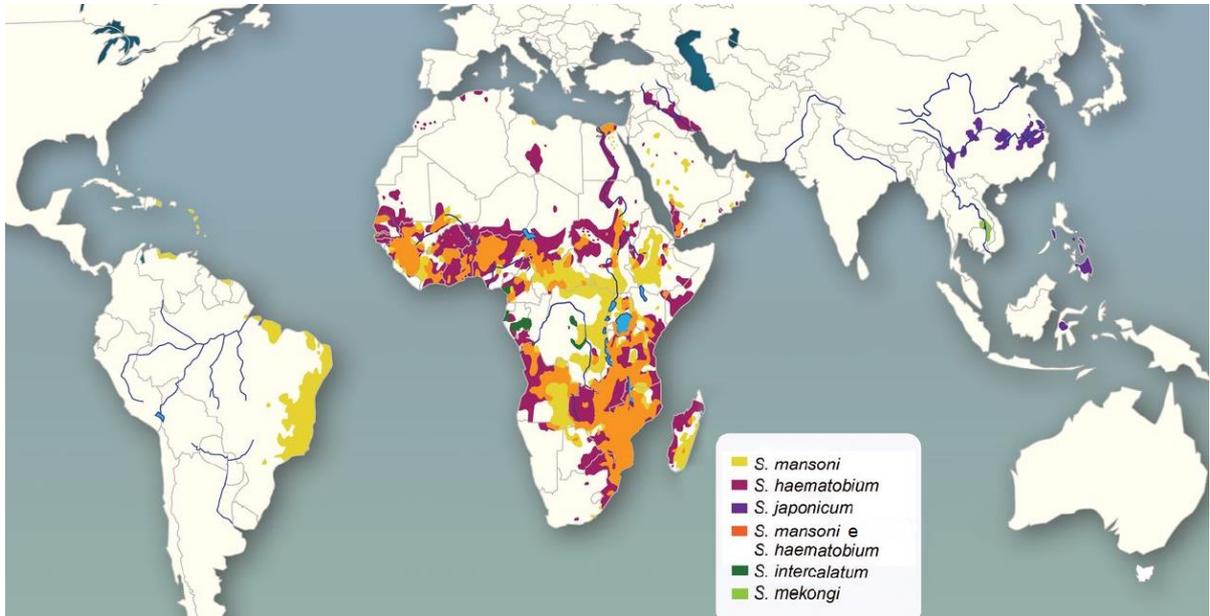
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

1.1.1 Distribuição da Doença

A esquistossomose é uma doença negligenciado tropical causada por parasitos do gênero *Schistosoma* (WHO, 1998). É uma doença veiculada pela água e é endêmica em 78 países de áreas tropicais e subtropicais do globo (Figura 1). A esquistossomose apresenta como agentes etiológicos principais *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*, os quais apresentam variadas distribuições geográficas entre os países. Desse modo, o *Schistosoma mansoni* pode ser encontrado na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname. O *Schistosoma japonicum* pode ser encontrado na China, Indonésia e Filipinas. O *Schistosoma haematobium* pode ser encontrado na África, Oriente médio e Córsega (França). Já o *Schistosoma mekongi*, na Camboja e República Democrática Popular do Laos e o *Schistosoma intercalatum*, na África Central (WHO, 2023).

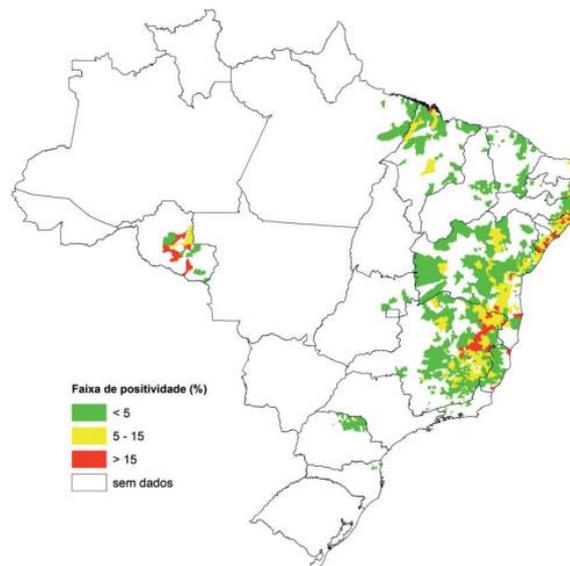
Figura 1: Distribuição mundial da esquistossomose



Fonte: WEERAKOON et al., 2015

No Brasil, a espécie prevalente é a *Schistosoma mansoni*, a qual tem uma distribuição ampla entre os estados e apresentou uma prevalência de 0,99% no país no último inquérito nacional de 2011 a 2014 (KATZ, 2018). É uma doença endêmica em alguns estados do Nordeste e em Minas Gerais, além de ter focos de transmissão em outros estados (Figura 2) (FRAZÃO, 2021).

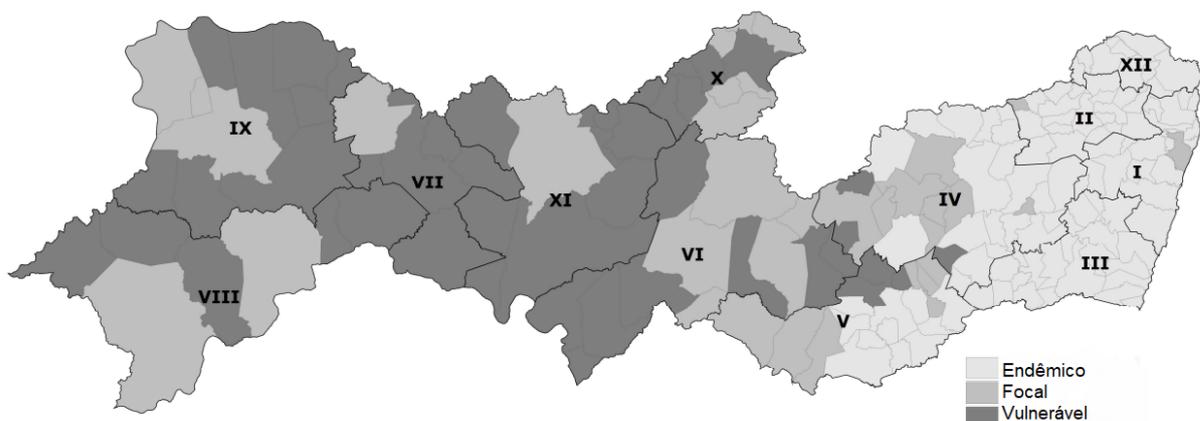
Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil



Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS

No estado de Pernambuco, a esquistossomose é endêmica em 101 dos 185 municípios, como é destacado na Figura 3 e, em sua maioria, os casos são notificados na zona da mata e na Região Metropolitana do Recife (BARRETO et al., 2015; SAUCHA, et al. 2015). Ademais, entre 2008 e 2014 foram identificados 72,6% pacientes, dentre 1411 testados, com a forma grave da doença (BARBOSA et al., 2016).

Figura 3: Distribuição da esquistossomose em Pernambuco



Fonte: SANAR, 2017

1.1.2 Agente Etiológico e Ciclo

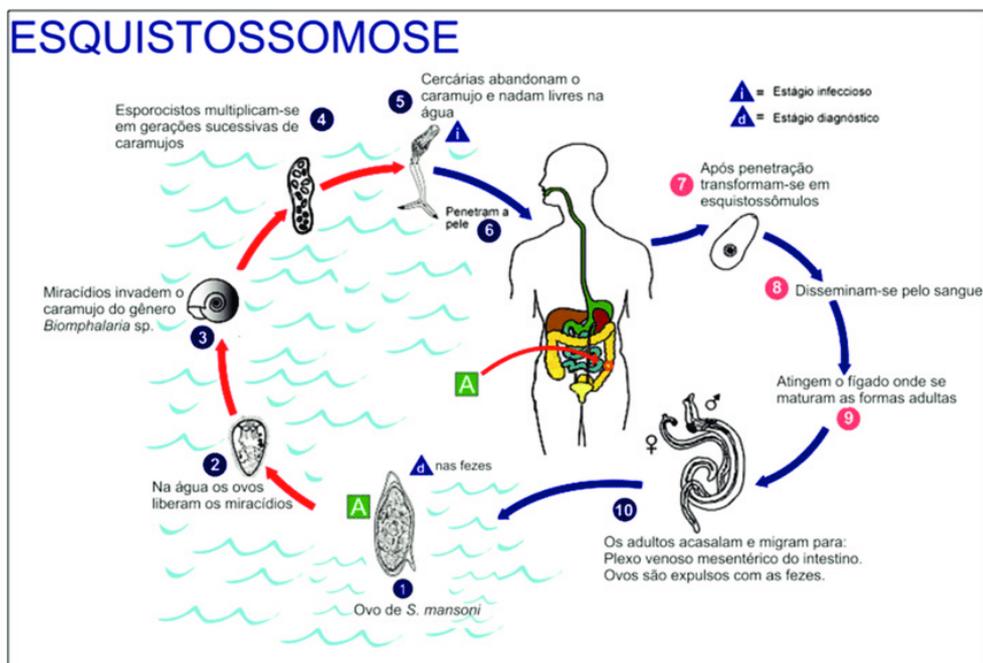
O agente etiológico da esquistossomose mansônica é o helminto *Schistosoma mansoni*, classificado como um platelminto achatado da classe Trematoda que possui dimorfismo sexual. Ademais, os parasitos também apresentam ventosas orais e ventrais para sua adesão e são classificados como hemoparasitos, visto que vivem no sangue (MELO; PINTO, 2016; MCMANUS et al., 2018).

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* é heteroxeno, ou seja, possui dois hospedeiros, um intermediário, no qual tem sua fase de reprodução assexuada, e um definitivo, no qual tem a fase de reprodução sexuada. Seu hospedeiro intermediário é o caramujo do gênero *Biomphalaria*, que vive em água doce (MELO; COELHO, 2016; HAILEGEBRIEL, 2022). Em adição, durante seu ciclo de vida, o *Schistosoma mansoni* passa por 6 fases evolutivas: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e

verme adulto (Figura 4) (REY, 2015).

O ciclo do *S. mansoni* se inicia com a liberação dos ovos do *Schistosoma mansoni* nas fezes. O ovo do *Schistosoma mansoni* possui um formato oval e um espículo lateral, apresenta uma casca translúcida e possui um miracídio em seu interior. Ao entrarem em contato com a água, os ovos eclodem, liberando o miracídio, o qual é a forma evolutiva que infecta o hospedeiro intermediário. Ao infectar o caramujo do gênero *Biomphalaria*, o miracídio se reproduz assexuadamente e se transforma em esporocisto e, em 4 a 6 semanas, em cercária. A cercária é liberada na água em condições adequadas de luz e temperatura, sendo esta a forma evolutiva que infecta o hospedeiro definitivo, o ser humano, quando este entra em contato com a água. Após a cercária penetrar na pele do homem, ela perde sua cauda e se transforma em esquistossômulo, o qual entra na corrente sanguínea e migra pela circulação para os pulmões e fígado, onde atingem a fase adulta e, com a maturidade sexual, iniciam o acasalamento. Após isso, os vermes adultos migram para as veias mesentéricas e iniciam a postura de ovos, os quais passam pela parede intestinal, amadurecem e são eliminados nas fezes, para o início de um novo ciclo (COELHO, 2008; REY, 2001).

Figura 4: Ciclo do *S. mansoni*



Fonte: GOMES, 2017

1.1.3 Hospedeiro Intermediário

O vetor da esquistossomose, caramujos do gênero *Biomphalaria*, vivem em água doce parada ou com pouca correnteza, como rios e canais. Porém, possuem uma alta capacidade de adaptação a outros locais úmidos, como locais alagados, bueiros e esgotos (PIERI et al., 2012). No Brasil, existem 3 principais espécies de *Biomphalaria*, as quais são infectadas pelo *Schistosoma mansoni* e possibilitam a continuidade do ciclo de vida: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (DE MENDONÇA, 2022).

O *Biomphalaria glabrata* (Figura 5) é a espécie que apresenta a melhor adaptação como hospedeiro intermediário, visto que possui uma alta capacidade de sobreviver à infecção. Tem uma distribuição na faixa litorânea do Brasil, do Pará até o Rio Grande do Sul (Figura 6 A) (BEZERRA; FERNANDEZ; THIENGO, 2016).

Figura 5: Caramujo *Biomphalaria glabrata*

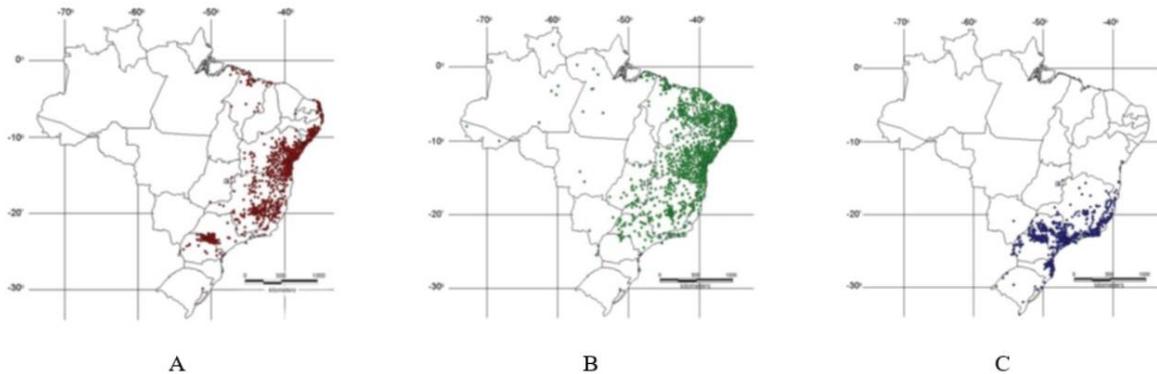


Fonte: AQUAPORTAIL, 2012.

No entanto, o *Biomphalaria straminea* apresenta uma baixa susceptibilidade ao *S. mansoni* e libera menos cercárias que o *B. glabrata* (BEZERRA; FERNANDEZ; THIENGO, 2016; MELO; COELHO, 2016). Apesar disso, o *B. straminea* tem uma grande distribuição no país, só não está presente no Amapá e em Rondônia (Figura 6 B) (BRASIL, 2008).

Já o *Biomphalaria tenagophila*, possui uma baixa taxa de infecção e tem uma distribuição da Bahia ao Rio Grande do Sul (Figura 6 C) (BEZERRA; FERNANDEZ; THIENGO, 2016; BRASIL, 2008).

Figura 6: Distribuição dos hospedeiros intermediários da esquistossomose no Brasil, (A) *Biomphalaria glabrata*, (B) *Biomphalaria straminea* e (C) *Biomphalaria tenagophila*.



Fonte: Adaptado de CARVALHO et al., 2008

1.1.4 Fisiopatologia

As manifestações clínicas da doença são causadas pelo contato com as formas evolutivas do *Schistosoma*, principalmente pelo ovo. A partir do contato da cercária com seu hospedeiro definitivo, esta penetra na pele e causa uma reação inflamatória chamada dermatite cercariana (JAUREGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2010). Já na fase de esquistossômulo, na circulação, o *Schistosoma mansoni* pode causar reações de hipersensibilidade, como mal estar, febre e tosse seca, por onde passa devido a resposta do sistema imunológico aos antígenos do verme (LAMBERTUCCI, 2014; REY, 2008). Quando verme adulto, nas veias do sistema porta, ocorre a liberação de antígenos que também causam uma resposta do sistema imune, com sintomas de dor intestinal, diarreia, cefaléia, entre outros (DOMINGUES; FERRAZ, 2012; FERNANDES, 2019; REY, 2008).

O ovo do *Schistosoma mansoni* é um dos principais responsáveis pelos sintomas clínicos. Após a postura dos ovos, estes passam pela parede intestinal e são eliminados nas fezes, mas nem todos passam e alguns ficam presos, causando uma intensa reação inflamatória granulomatosa. Entretanto, alguns ovos podem ser arrastados na circulação e ficam presos no fígado, causando uma reação inflamatória com formação de granuloma e, posteriormente, uma fibrose periportal, chamada Fibrose de Symmers (DOMINGUES; FERRAZ, 2012; ANDRADE, 2004).

1.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da esquistossomose é baseado nas características clínicas que o paciente apresenta no momento da anamnese. Ademais, também são realizados exames laboratoriais para a confirmação da doença. Dentre esses, os principais são testes parasitológicos, imunológicos e moleculares (DOS SANTOS SOUZA, 2021).

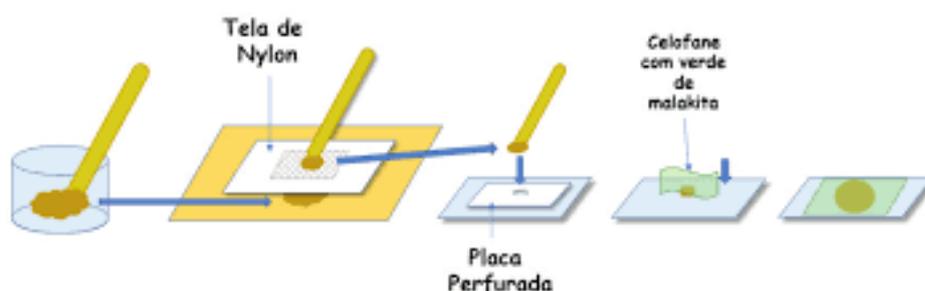
1.2.1 Parasitológico

O diagnóstico parasitológico da esquistossomose é realizado para a identificação direta de alguma forma evolutiva do parasito. O Kato-Katz (KK) é a técnica parasitológica considerada pela OMS como padrão ouro, cuja técnica pode identificar a intensidade da infecção por meio da quantificação dos ovos de *Schistosoma mansoni* (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972; WHO, 2012).

A técnica de Kato-Katz é realizada como destacada na Figura 7: As fezes são filtradas em uma malha de 60 a 105 μm e a quantidade filtrada é depositada em uma placa com um furo sobre uma lâmina, cujo furo permite que a quantidade de fezes filtradas colocadas na lâmina seja de 41,7 mg. Após isso, a amostra é coberta com uma lamínula plástica contendo o corante verde malaquita e a lâmina pode ser lida após seca (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972).

Quando a amostra é visualizada pelo microscópio óptico, são contados todos os ovos da lâmina. O número total de ovos é multiplicado por 24 e se obtém o valor de ovos por grama de fezes (OPG) e a intensidade da infecção, que é classificada como leve (abaixo de 100 OPG), moderada (entre 100 e 399 OPG) ou grave (igual ou acima de 400 OPG) (UZTINGER, 2015).

Figura 7: Técnica parasitológica Kato-Katz



Fonte: JUNIOR; CALVÃO, 2020

A técnica de Kato-Katz apresenta uma boa sensibilidade quando a intensidade de infecção é alta ou moderada. Allam et al. (2022) relataram uma sensibilidade de 91,3% e 100% de especificidade quando avaliaram a técnica em uma população de 50 crianças. Porém, apresenta limitações quando o paciente apresenta uma baixa carga parasitária ou para identificar a doença em pacientes que vivem em áreas de baixa endemicidade (ENK, 2008). Como destacado por Okoyo et al. (2018), em uma área de baixa endemicidade, na qual a sensibilidade obtida para o Kato-Katz foi de 12,5%, quando o teste foi avaliado em 1878 crianças na Quênia.

Ademais, métodos adicionais para a detecção parasitológica da esquistossomose, utilizadas em menor escala, são técnicas de sedimentação, como a de Hoffman e a de Lutz, técnica de eclosão dos miracídios e biópsias em pacientes com suspeita da doença que não apresentem ovos nas fezes (BRASIL, 2014; GRAY, et al., 2011; LINDHOLZ et al., 2018; ZHAO et al., 2012).

1.2.2 Imunológico

Os testes imunológicos são utilizados na detecção de antígenos circulantes do *Schistosoma mansoni* ou anticorpos específicos contra o parasito (DE JONGE et al, 1991).

Os antígenos do parasito são liberados durante seus estágios evolutivos, como antígeno cercariano, do ovo e do verme adulto e estes podem ser identificados no soro dos pacientes. Ademais, os anticorpos são detectados de forma indireta por meio de preparações de antígenos dos parasitos (ABDEL-HAFEZ et al, 1983; DEELDER et al, 1994).

Um dos testes mais utilizados é o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), o qual se baseia na utilização de uma placa sensibilizada com antígenos ou anticorpos e possui várias variações, como ELISA direto, indireto, sanduíche e competitivo (ENGVALL; PERLMANN, 1971; LINDSTROM; WAGER, 1978; KATO, 1977; YORDE, 1976). Ademais, apresenta sensibilidade que varia de 65,3% a 100% e especificidade de 57,4% a 100% (VENGESAI et al., 2023).

Outra forma de diagnóstico imunológico bastante utilizada é a detecção de dois antígenos circulantes, os antígenos catódicos (CCA) e anódicos circulantes (CAA), os quais são liberados na circulação por meio da regurgitação de resíduos da

alimentação do parasito (HOCKLEY, 1973; SILVA-MORAES et al., 2019). A partir disso, foi criado um teste rápido para a detecção dos antígenos catódicos em amostra de urina, o POC-CCA, cujos estudos relatam uma sensibilidade de 91,7% a 99,5% e especificidade de 63,4% a 75% (FUSS et al., 2018; LAMBERTON et al., 2014).

Contudo, testes imunológicos apresentam uma sensibilidade mais baixa em locais de baixa endemicidade e também para detecção de pacientes com uma baixa carga parasitária, pois há também a redução dos antígenos circulantes (VAN LIESHOUT et al., 1995).

1.2.3 Molecular

As técnicas moleculares são utilizadas para detectar DNA ou RNA do parasito. São técnicas muito utilizadas em áreas de baixa endemicidade, devido a sua alta sensibilidade, o que auxilia na detecção da doença em pacientes com baixa carga parasitária (MACMANUS et al., 2018). Nas reações de amplificação de DNA, a região a ser amplificada (alvos moleculares) correspondem às regiões do genoma do *Schistosoma mansoni*. Destas, os alvos MIT e ITS foram descritos por Fernández-Soto em 2014 e 2020, respectivamente, e são regiões específicas para o *S. mansoni*. Além dessas, outras já foram utilizadas, como a região Sm1-7 e região minissatélite (HAMBURGER et al., 1991; OBENG et al., 2008; PENA et al., 1995).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação de DNA amplamente utilizada, que atua por meio de ciclos de variação de temperatura e possui 3 etapas: A primeira etapa é a Desnaturação, na qual a temperatura varia de 90 a 95 °C, em que ocorre a quebra das ligações de hidrogênio entre a dupla fita do DNA. Após isso, inicia-se a etapa de anelamento, de 50 a 70 °C, na qual um par de oligonucleotídeos sintéticos, chamados *primers*, se ligam às fitas desnaturadas. Por fim, a enzima Taq polimerase, que realiza a função de DNA polimerase, faz a extensão da fita por meio da adição de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). A visualização do produto final da PCR é realizada por meio de eletroforese em gel de agarose (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2006).

Alguns estudos com a PCR, com o alvo molecular *Sm1-7*, observaram que a mesma apresenta uma sensibilidade de 91% e 100% de especificidade na identificação de indivíduos com esquistossomose (CARNEIRO et al., 2013; HAMBURGER et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2010). Ademais, a PCR pode ser

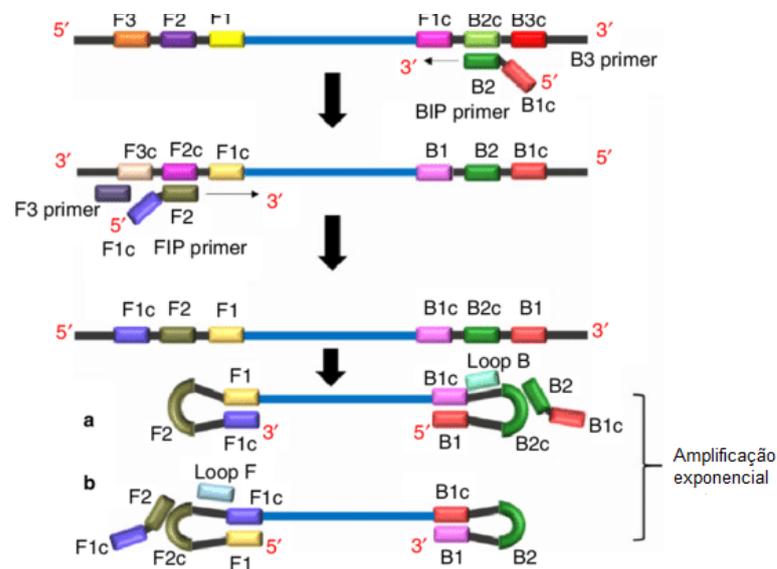
realizada para diferentes tipos de amostras, como caramujos infectados e amostras biológicas humanas de fezes, soro e urina (HAMBURGER et al., 1998a; HAMBURGER et al., 1998b; HAMBURGER et al., 1991; ENK et al., 2012). Carvalho et al. (2012), ao avaliarem a PCR e o Kato-Katz em áreas de baixa endemicidade, obtiveram uma sensibilidade de 7,3% para o KK e de 34,7% para a PCR, demonstrando que a PCR conseguiu identificar os indivíduos com baixa carga parasitária que não foram positivos para o teste parasitológico.

Ademais, a PCR possui variações que também são bastante utilizadas, como a Nested PCR e a PCR em tempo real. A Nested PCR envolve duas reações de amplificação, cada uma com um par diferente de primers e apresenta como alvo a região 18S do DNA ribossômico (*DNAr*) de *S. mansoni* (MELO et al., 2006). O produto da primeira reação de amplificação é utilizado como molde para a segunda PCR. Assim, a utilização desses dois pares de *primers* permite realizar um maior número de ciclos, aumentando, assim, a especificidade da PCR (GREEN; SAMBROOK, 2019). No Brasil, a Nested PCR é muito utilizada no monitoramento de caramujos em focos de transmissão da esquistossomose (JANNOTTI-PASSOS, 2006). Ademais, um estudo de Wanderley no Brasil, em 2017, encontrou uma sensibilidade de 0,1 fg e uma especificidade de 100% para a Nested PCR. Em relação a PCR em tempo real, é uma variação da PCR que facilita a obtenção do resultado, visto que não é necessária a etapa de revelação com o gel de agarose. Ademais, a PCR em tempo real utiliza sondas fluorescentes que são detectadas pelo termociclador, o qual produz um gráfico, no qual é possível avaliar a quantidade de DNA-alvo na amostra (LEITE et al., 2015). As tecnologias de qPCR mais utilizadas são SYBR Green e TaqMan. A sonda TaqMan se liga entre os dois primers e detecta a amplificação pela degradação da sonda pela Taq polimerase e liberação do fluoróforo, já a sonda que utiliza o fluoróforo SYBR Green detecta a amplificação por meio da ligação do corante ao DNA de cadeia dupla sintetizada (CAO; SHOCKEY, 2012). Alguns estudos também destacam a PCR em tempo real como uma melhor opção para a detecção da doença em áreas de baixa endemicidade, quando comparada com técnicas parasitológicas, apresentando uma sensibilidade de 80% e especificidade de 92,4% (GUENGAN, 2019; ESPÍRITO-SANTO, 2014).

A amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP) é uma técnica desenvolvida por Notomi et al. (2000), que também é uma variação da PCR. O LAMP possui as mesmas 3 etapas da PCR, desnaturação, anelamento e extensão, a

diferença é que funciona em condições isotérmicas, em apenas uma temperatura que varia de 60 a 65°C. Além disso, no LAMP, há *primers* internos, *forward inner primers* (FIP) e *backward inner primers* (BIP), *primers* externos, F3 e B3 e *loop primers*, os quais se ligam ao DNA alvo e iniciam a síntese, resultando na formação de alças (Figura 8, 'a' e 'b'), que permitem que a sequência alvo seja amplificada 13 vezes a cada meio ciclo (Figura 8). Assim, a utilização dos 3 pares de *primers* garante uma alta especificidade na amplificação do DNA da amostra (NOTOMI, 2000; 2015).

Figura 8: Amplificação realizada na técnica de LAMP



Fonte: Adaptado de WONG et al., 2018.

Dessa forma, o LAMP é bastante utilizado no diagnóstico da esquistossomose e, devido a sua reação isotérmica, amplamente avaliada para diagnóstico em campo (ABBASI, 2010; GOMES; BARBOSA JÚNIOR; MELO, 2022; GANDASEGUI, 2016; FERNÁNDEZ-SOTO, 2020). Ademais, Abassi et al. (2010), o LAMP em caramujos infectados com *S. mansoni* e *S. haematobium*, no qual o resultado foi positivo após apenas um dia de infecção, o que demonstra a alta sensibilidade da técnica, a qual, neste trabalho, foi de 0,1 fg. Em 2013, outra pesquisa foi realizada para avaliar a eficácia do LAMP em campo, comparando com PCR em tempo real e PCR convencional. A sensibilidade obtida para o LAMP pelos pesquisadores foi maior que a sensibilidade da PCR convencional em caramujos infectados com 1-2 miracídeos

com apenas cinco dias de infecção (HAMBURGER et al., 2013).

Assim, o LAMP é uma técnica que apresenta um potencial para ser utilizada em campo e pode ser adaptada para, futuramente, se tornar um teste *point-of-care*. Porém, ainda apresenta viés de possibilidade de contaminação no ambiente e dificuldade de estabilização dos reagentes em uma temperatura adequada. Para isso, pesquisas vêm sendo realizadas com a liofilização dos reagentes para que a estabilidade da técnica seja mantida e seu manuseio minimizado, o que pode ajudar a reduzir contaminações (GARCÍA-BERNALT, 2019; MARUSHCHAK et al., 2020; MWANGI, 2018). Dessa forma, este trabalho realizou uma avaliação em dois sistemas de LAMP, verificando a possibilidade da aplicabilidade da técnica como alternativa diagnóstica mais sensível e rápida em condições de campo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da sensibilidade de técnicas moleculares baseadas em LAMP para o diagnóstico da esquistossomose mansônica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a sensibilidade analítica dos sistemas SmMIT-LAMP e SmITS-LAMP liofilizados com quantidades conhecidas de DNA genômico de *S. mansoni*;
- Verificar o desempenho dos reagentes do SmITS-LAMP não liofilizados durante um intervalo de tempo fixo.

3 METODOLOGIA

A proposta foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE), sob o CAAE 33600620.5.0000.5190, de acordo com o Código de Ética (ANEXO A).

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Inicialmente, foi realizada a extração de DNA genômico de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, disponibilizados pelo Laboratório de Referência de Esquistossomose (SRE) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ).

A partir disso, foi realizado o protocolo de extração por fenol-clorofórmio, adaptado pelo Laboratório de Esquistossomose, a partir do método estabelecido por Sambrook et al. (1989).

Foram utilizados cinco vermes adultos machos da cepa LE de *Schistosoma mansoni*. Foi adicionado 1000µl de tampão de lise (50mM Tris, 100mM EDTA, 1% SDS, pH 8,0) e 1 mg/ml de proteinase K aos vermes e todos os componentes foram homogeneizados e incubados na estufa (Fanem, São Paulo, Brazil) a 56°C por 12 horas. Após isso, a mistura foi vortexada e centrifugada (Damon, Bedfordshire, UK) a 14.000 rpm por 5 minutos e, aproximadamente, 800µl de sobrenadante foi transferido para um tubo estéril. A extração foi seguida pela adição de 800 µl de fenol, sendo levemente homogeneizada e, então, centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e extraído com fenol:clorofórmio (1:1) por centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. Esta etapa foi novamente repetida. Depois disso, o sobrenadante foi retirado e adicionado ao clorofórmio (1:1), seguido por centrifugação de 14.000 rpm por 1 minuto. Por conseguinte, foi adicionado álcool isopropílico ao sobrenadante (1:1) e deixado em repouso até a precipitação completa do DNA, durante 20 minutos em um freezer a - 20°C. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi decantado, e então foi aguardada a secagem do DNA. Por fim, foi adicionado 500 µl de água livre de nucleases para a ressuspensão do material genético, incubando a 90°C no Thermomixer™ (Eppendorf, Hamburg, Germany), por 30 minutos, para a inativação de enzimas capazes de degradar o DNA. Assim, o DNA genômico extraído dos vermes foi utilizado para a construção de uma curva de sensibilidade analítica de fator 10.

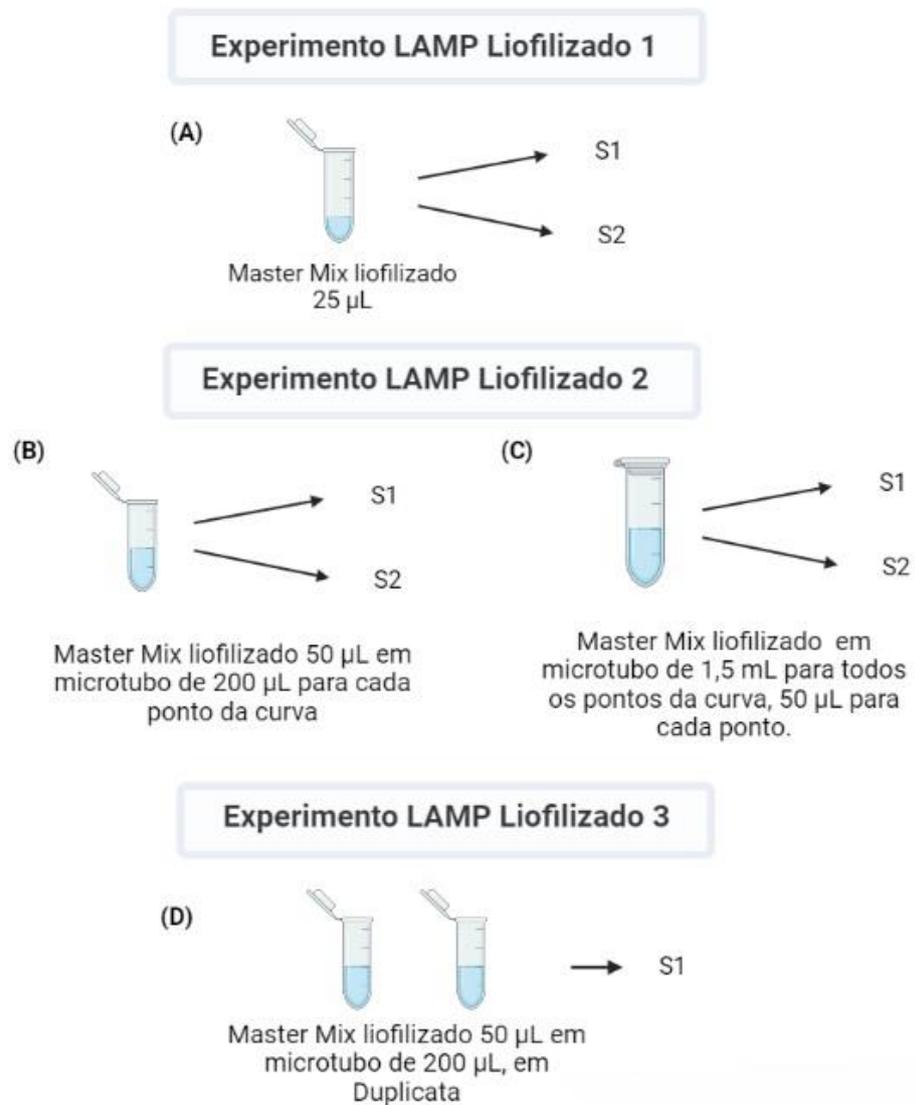
3.2 CURVA DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A partir do DNA genômico dos vermes adultos, foi realizada uma diluição em série para a obtenção da curva de sensibilidade. A curva de diluição seriada realizada foi de fator 10 (1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg) para avaliar a sensibilidade analítica. Assim, a curva de sensibilidade analítica foi utilizada em todos os testes para a obtenção do limite de detecção dos sistemas LAMP avaliados.

3.3 SISTEMAS LAMP LIOFILIZADOS

Para a realização da liofilização dos sistemas LAMP, foram utilizados protocolos adaptados. Antes da liofilização, foi realizado um experimento para o SmITS-LAMP e o SmMIT-LAMP para avaliar a sensibilidade dos sistemas não liofilizados. Após isso, foi realizada a liofilização no Liofilizador Labconco (Triad, Kansas, Missouri, EUA) por um tempo aproximado de 6 horas.

A liofilização foi realizada com dois Sistemas para cada LAMP. O Sistema 1 (S1), com todos os reagentes liofilizados, e o Sistema 2 (S2) sem a betaína e sem a enzima Bst 2.0 WarmStart[®], que somente foram adicionadas no momento do experimento. Os experimentos realizados com o LAMP liofilizado estão apresentados na Figura 9 abaixo. Após a amplificação, todos os Sistemas (S1 e S2) dos 3 experimentos foram avaliados por uma curva de sensibilidade analítica.

Figura 9: Experimentos realizados com o LAMP Liofilizado

Fonte: o autor

O teste LAMP Liofilizado 1 foi realizado em volume de 25 µL para cada reação, em cada sistema (S1 e S2) (Figura 9 (A)). No entanto, o teste LAMP Liofilizado 2 foi realizado também para avaliar se a liofilização apresenta melhor desempenho com o mix em tubos de 200 µL para cada concentração da curva ou todo o mix em apenas um tubo de 1,5 mL (Figura 9 (B) e (C)). Já o teste LAMP Liofilizado 3, em duplicata, foi realizado para avaliar a reprodutibilidade do teste (Figura 9 (D)).

3.3.1 Protocolo SmITS-LAMP-L

No SmITS-LAMP foi utilizado o protocolo de Gomes et al. (2022). A partir deste, foram realizados dois Master mix com um volume final de 25 μ L de reação. Foi adicionado no Master mix para o Sistema 1 (S1): 1,6 pmol cada um dos *primers* FIP (5'-ATCGCCCTTGGCAGATCAGGCTGTCGTATGCCCTGATGG-3') e BIP (5'-ATATGCATGCAAATCCGCCCGCGGATCGCTTCAACAGTGTA-3'), 0,4 pmol de cada *primer* F3 (5'-TTGACCGGTACCAGC-3'), B3 (5'-CGTGAATGGCAAGCCAAAC-3') e Loop (5'-CAGATCAGGCAACCCGAAAG-3'), 1,8 mM de dNTP (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 1x Tampão de Amplificação Isotérmica [20 mM Tris -HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Tween 20] (New England Biolabs, Reino Unido), 0,2 M betaína (Sigma, EUA), 6 mM adicionais de MgSO₄ (New England Biolabs, Reino Unido) e 8 U de Bst 2.0 WarmStart® DNA polimerase (New England Biolabs, Reino Unido), além de DNA extraído dos vermes e água ultrapura.

Em relação ao Sistema 2 (S2), foram adicionados no Master mix os mesmos reagentes, com exceção da Betaína e da Bst 2.0 WarmStart® DNA polimerase, que foram adicionadas apenas no momento da reação.

3.3.2 Protocolo SmMIT-LAMP-L

No SmMIT-LAMP, foi utilizado o protocolo adaptado de Fernandez-Soto et al. (2014). A partir deste, foram realizados dois Master mix com um volume final de 25 μ L de mistura de reação. Foi adicionado no Master mix para o Sistema 1 (S1): 1,6 pmol cada um dos *primers* FIP (5'-GCCAAGTAGAGACTACAAACATCTT-TGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT3') e BIP (5'-AGAAGTGTTTAACTTGATGAAGGGG-AAACAAAACCGAAACCACTA-3'), 0,4 pmol de cada *primer* F3 (5'-TTATCGTCTATAGTACGGTAGG-3') e B3 (5'-ATACTTTAACCCCAACCA-3'), 2,4 mM de cada dNTP (Invitrogen, Massachusetts, EUA), 1x Tampão de Amplificação Isotérmica [20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Tween20] (New England Biolabs, Reino Unido), 0,2 M betaína (Sigma, EUA), 6 mM adicionais de MgSO₄ (New England Biolabs, Reino Unido) e 8 U de Bst 2.0 WarmStart® DNA polimerase (New England Biolabs, Reino Unido), além de DNA extraído dos vermes e água ultrapura.

Em relação ao Sistema 2 (S2), foram adicionados no Master mix os mesmos reagentes, com exceção da Betaína e da Bst 2.0 WarmStart® DNA polimerase, que foram adicionadas apenas no momento da reação.

3.4 ESTABILIDADE AO LONGO DO TEMPO SMITS-LAMP

Para realizar a avaliação da estabilidade do SmITS-LAMP ao longo do tempo, foi empregado o mesmo protocolo do SmITS-LAMP estabelecido por Gomes et al. (2022). A partir disso, foram divididos dois sistemas para armazenamento, ambos não liofilizados em tubos de 1,5 mL. O sistema 1 com todos os reagentes misturados no Master mix e o Sistema 2 com todos os reagentes, exceto a Betaína e a enzima Bst 2.0 WarmStart® DNA polimerase que foram adicionadas no momento do experimento.

Ambos os Sistemas foram armazenados de duas formas, na geladeira a 4°C e no congelador a -25°C. Após isso, o experimento LAMP foi realizado em 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias e foi realizada uma curva de sensibilidade para cada sistema para avaliar até que ponto o sistema permaneceu estável.

3.5 REVELAÇÃO DOS RESULTADOS LAMP

Os tubos de reação foram inseridos no BIOER LifePro Thermo Cycler (Hangzhou, China) a uma temperatura constante de 61 °C por 70 min e depois aquecidos a 80 °C por 5 min, para que a reação fosse interrompida.

Foram utilizados controles negativos (água) em todos os ensaios LAMP. Os resultados positivos para o LAMP foram observados a olho nu pela alteração na cor após a adição de 2 µL de corante fluorescente SYBR Green I diluído 1:10 na concentração de 10.000 X (Invitrogen, Massachusetts, EUA) aos tubos de reação pós-amplificação. Uma fluorescência verde corresponde a uma reação LAMP positiva, enquanto a laranja original indica uma reação negativa.

4 RESULTADOS

4.1 CURVA DE SENSIBILIDADE PARA O SMMIT-LAMP E SMITS-LAMP ANTES DA LIOFILIZAÇÃO

A avaliação do SmMIT-LAMP antes da liofilização dos reagentes apresentou uma sensibilidade de 100 pg (Figura 10).

FIGURA 10: Curva de sensibilidade analítica detectada por meio do *SmMIT-LAMP* (100pg), a partir da extração de DNA de *Schistosoma mansoni*. Controle negativo representado por CN.



Fonte: o autor

Para o SmITS-LAMP, o valor mínimo detectado foi de 10 fg (Figura 11) e, a partir deste protocolo, no qual foram obtidos os melhores resultados, foram realizados os experimentos seguintes.

FIGURA 11: Curva de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP (10fg), a partir da extração de DNA de *Schistosoma mansoni*. Controle negativo representado por CN.

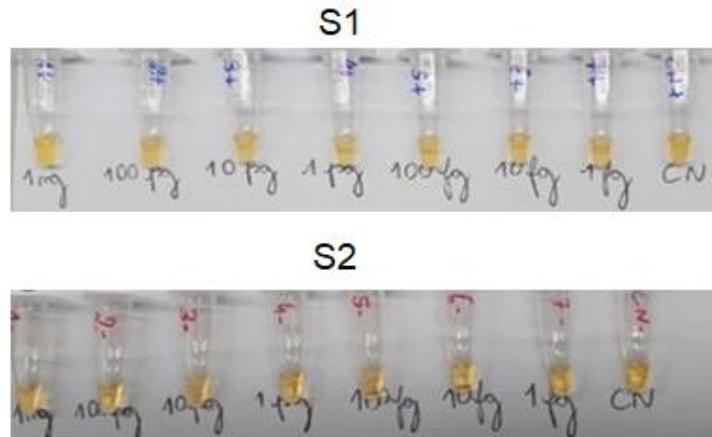


Fonte: o autor

4.2 SMITS-LAMP LIOFILIZADO 1 COM 25 µL

O resultado do teste de sensibilidade para os sistemas 1 e 2 estão apresentados na Figura 12. O S1 foi o único que apresentou amplificação, na concentração de 1 ng.

Figura 12: Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP, para o S1 (Com betaína e enzima) e S2 (Sem betaína e enzima) a partir da extração de DNA de *Schistosoma mansoni*. Controle negativo representado por CN.



Fonte: o autor

Para uma melhor visualização dos resultados os microtubos foram expostos à luz UV (Figura 13). A partir da Figura 14 é possível observar o único resultado positivo (S1 em 1 ng).

Figura 13: Resultados da sensibilidade do S1 e S2 sob luz UV



Fonte: o autor

Figura 14: Resultado aproximado da sensibilidade do S1 na concentração de 1 ng.



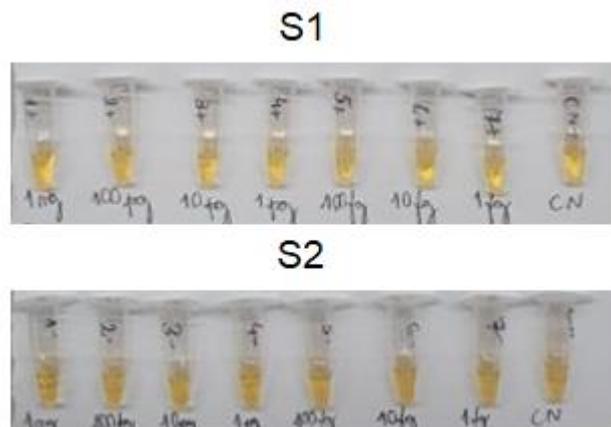
Fonte: o autor

4.3 SMITS-LAMP LIOFILIZADO 2 COM MASTER MIX DE 50 μ L EM MICROTUBOS DE 200 μ L E 1,5 ML

O teste com um volume de 50 μ L de mix para os Sistemas 1 e 2 com o mix liofilizado em um microtubo de 1,5 mL não apresentou amplificação, como pode ser visto abaixo na Figura 15, em que não houve mudança de cor após a adição do SYBR Green.

Figura 15: Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP com liofilização dos reagentes no tubo de 1,5 mL, para o S1 (Com betaína e enzima) e S2 (Sem betaína e enzima) a partir da extração de DNA de *Schistosoma mansoni*.

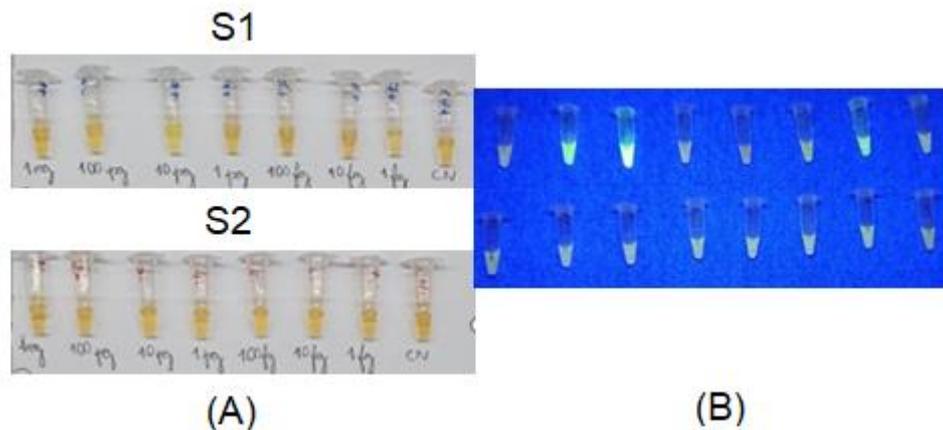
Controle negativo representado por CN.



Fonte: o autor

Já o teste realizado com o mix liofilizado nos microtubos de 200 μ L apresentou positividade nas concentrações de 100 pg, 10 pg e 1 fg, como destacado na Figura 16.

Figura 16: (A) Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP com liofilização dos reagentes no tubo de 200 μ L, para o S1 (Com betaína e enzima) e S2 (Sem betaína e enzima) a partir da extração de DNA de *Schistosoma mansoni*. Controle negativo representado por CN. (B) O mesmo resultado na luz UV.

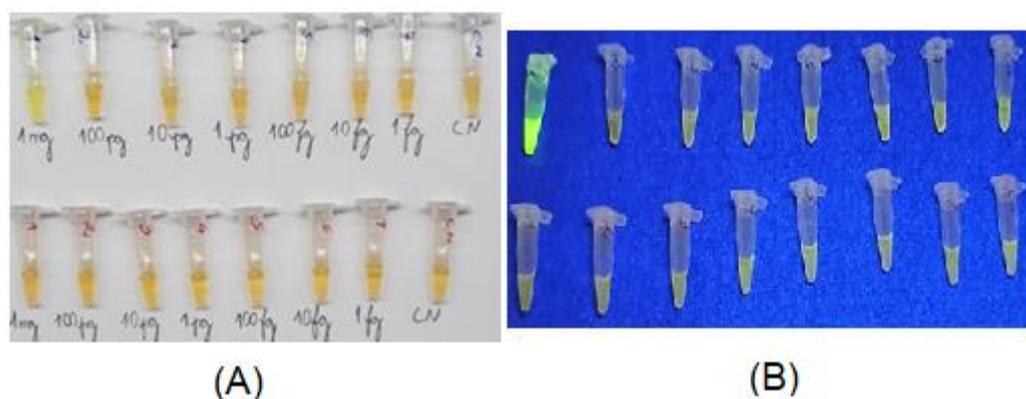


Fonte: o autor

4.4 SMITS-LAMP LIOFILIZADO 3 EM DUPLICATA

O experimento em tubos de 200 μ L com 50 μ L de volume final para o Sistema 1 foi repetido em duplicata e apresentou uma sensibilidade de 1 ng como pode ser observada na Figura 17.

Figura 17: (A) Resultado de sensibilidade analítica detectada por meio do SmITS-LAMP com liofilização dos reagentes no tubo de 200 μ L, para o S1 (Com betaína e enzima). Controle negativo representado por CN. (B) E o Mesmo resultado na luz UV.



Fonte: o autor

4.5 ESTABILIDADE DO MIX AO LONGO DO TEMPO

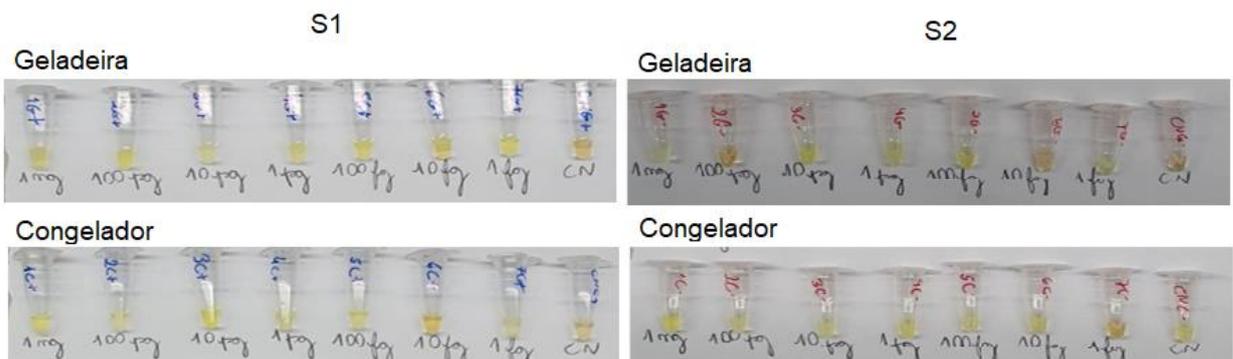
O teste para avaliar a estabilidade do mix armazenado em geladeira ou

congelador ao longo do tempo apresentou algumas instabilidades, como pode ser destacado nas figuras abaixo (Figuras 18-23). O mix que apresentou resultados mais estáveis ao longo do tempo foi o congelado do Sistema 1, em que apresentou essa estabilidade até 90 dias (Figura 22). Todos os resultados estão descritos na Quadro 1.

Quadro 1: Resultados da avaliação da estabilidade do LAMP ao longo do tempo

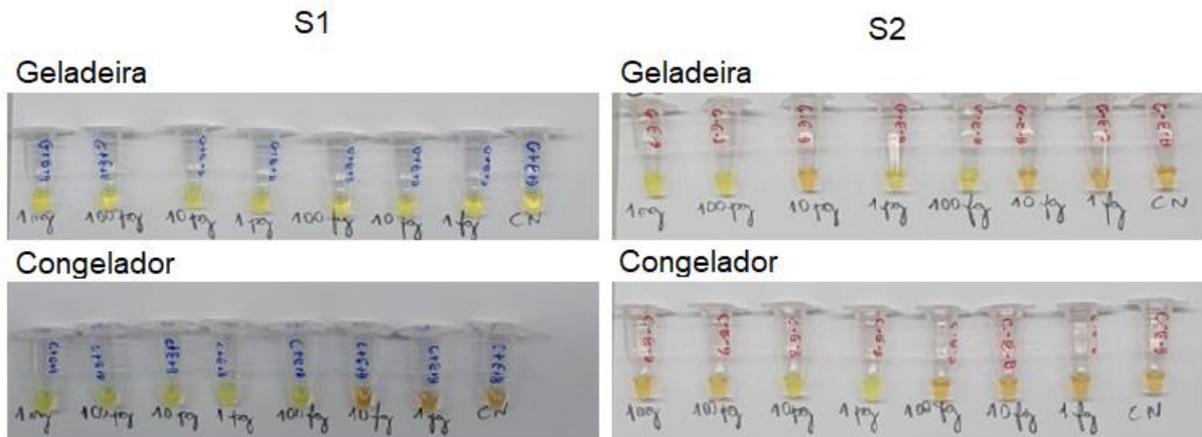
Dias	Resultado
0 dias	Sensibilidade de 1 fg para S1 (geladeira)
15 dias	Sensibilidade de 100 fg para S1 (congelador)
30 dias	Sensibilidade de 100 fg para S2 (geladeira)
60 dias	Sensibilidade de 100 fg para S2 (geladeira) e 1 pg para o S1 (congelador)
90 dias	Sensibilidade de 1 pg para o S1 (congelador)
180 dias	Nenhuma das condições manteve um bom padrão de sensibilidade

Figura 18: SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2), armazenado em geladeira e congelador no Tempo 0. Apresentou sensibilidade de 1 fg para S1 armazenado em geladeira.



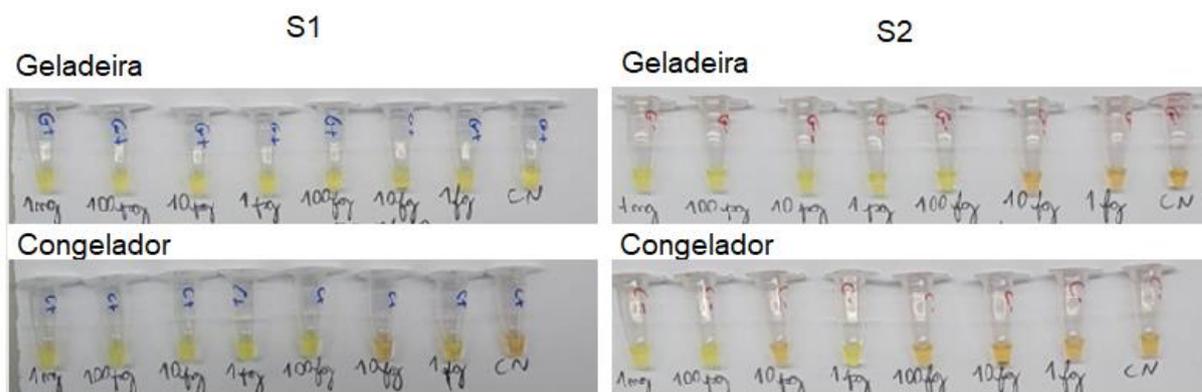
Fonte: o autor

Figura 19: SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2), armazenado em geladeira e congelador no Tempo 15 dias. Apresentou sensibilidade de 100 fg para S1 armazenado em congelador.



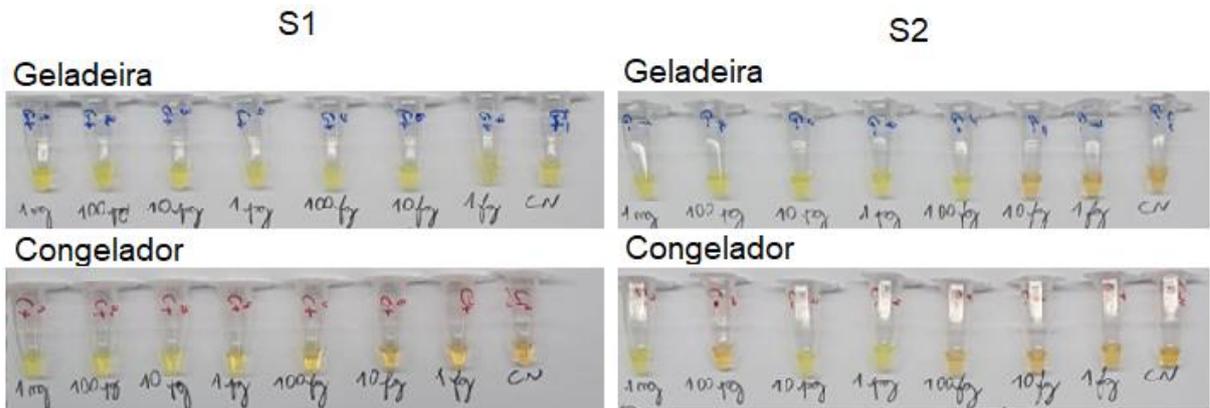
Fonte: o autor

Figura 20: SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2), armazenado em geladeira e congelador no Tempo 30 dias. Apresentou sensibilidade de 100 fg para S2 armazenado em geladeira.



Fonte: o autor

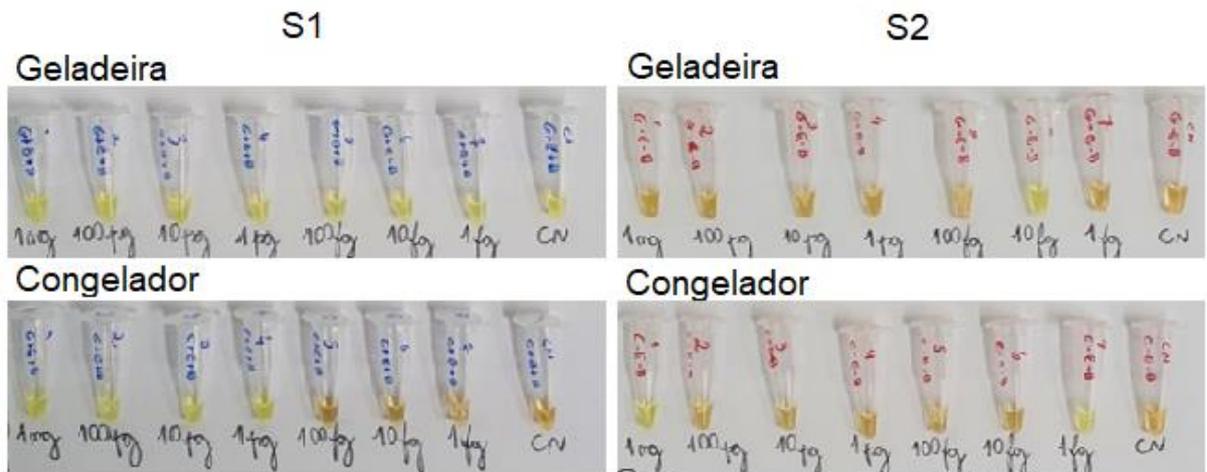
Figura 21: SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2), armazenado em geladeira e congelador no Tempo 60 dias. Apresentou sensibilidade de 100 fg para S2 armazenado em geladeira e 1 pg para o S1 armazenado em congelador.



Fonte: o autor

Figura 22: SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2), armazenado em geladeira e congelador no Tempo 90 dias.

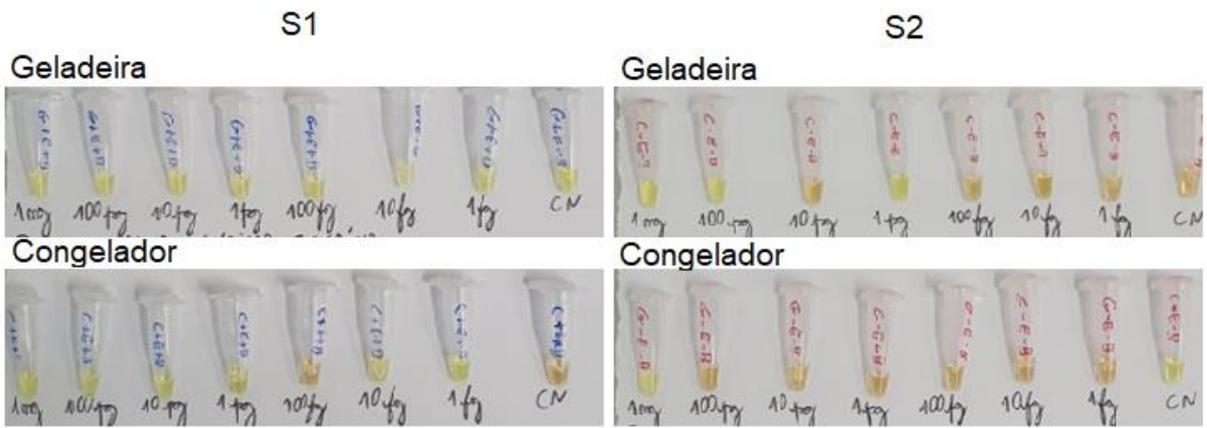
Apresentou sensibilidade de 1 pg para o S1 armazenado em congelador.



Fonte: o autor

Figura 23: SmITS-LAMP com mix não liofilizado com Enzima e Betaína (S1) e sem Enzima e Betaína (S2), armazenado em geladeira e congelador no Tempo 180 dias.

Nenhuma das condições manteve um bom padrão de sensibilidade.



Fonte: o autor

5 DISCUSSÃO

Os sistemas SmMIT-LAMP e SmITS-LAMP não liofilizados apresentaram sensibilidade analítica de 100 pg e 10 fg, respectivamente. Após a liofilização, o SmITS-LAMP apresentou uma redução na sensibilidade, a qual alcançou até 1 ng apenas para o Sistema 1 (S1), com betaína e com enzima. O mesmo resultado se repetiu quando realizado em duplicata de 50 mL. Ademais, nos testes com microtubos de 200 µL e 1,5 mL, apenas os testes realizados nos microtubos de 200 µL apresentaram positividade, nas concentrações de 100 pg, 10 pg e 1fg, apenas para o S1. Para a avaliação da estabilidade do SmITS-LAMP não liofilizado, ao longo do tempo, foi observado que o LAMP manteve por mais tempo a estabilidade apenas no S1 congelado a -25°C por 90 dias.

Em relação à curva de sensibilidade, o SmMIT-LAMP e o SmITS-LAMP apresentaram sensibilidade analítica de 100 pg e 10 fg, respectivamente. Já Fernández-Soto et al. (2014), na Espanha, obtiveram um resultado de 1 fg para o SmMIT-LAMP e em 2020 obtiveram um resultado de 1 pg para o SmITS-LAMP. Já Abassi et al. (2010), em Israel, alcançaram uma sensibilidade de 1 fg quando realizaram o LAMP com a região alvo *Sm1-7*. Com isso, é possível observar que não existe ainda uma padronização para a sensibilidade do LAMP, pois cada protocolo pode apresentar um resultado diferente, dependendo de suas variações nas concentrações e quantidades de reagentes, das diferentes regiões alvo, além de variações nos equipamentos utilizados.

Devido à redução da sensibilidade do SmMIT-LAMP, este não seguiu para os experimentos de liofilização, visto que se espera uma diminuição na sensibilidade da técnica após sua liofilização, como foi observado no SmITS-LAMP. Para evitar a possível redução da sensibilidade, Carter et al. (2018), Chen et al. (2017), García-Bernalt et al. (2019) e Agel (2020) utilizaram estabilizantes em seus estudos com LAMP, os quais são a base de açúcares, como a Trealose, a Sacarose e a Estaquiase e, com isso, não observaram perdas significantes de sensibilidade. Logo, o uso de estabilizantes para a liofilização de reagentes é algo que pode ser explorado em trabalhos futuros para que o sistema LAMP se mantenha com uma boa sensibilidade.

Após a liofilização do SmITS-LAMP, a sensibilidade obtida para o teste foi de 1 ng. Já Hayshida et al. (2015), no Japão, obtiveram uma sensibilidade de 100 fg para a técnica de LAMP liofilizada para o protozoário *Trypanosoma brucei*. Entretanto,

García-Bernalt et al. (2019), na Espanha, avaliaram o LAMP liofilizado para *Schistosoma mansoni* e obtiveram resultados positivos para uma concentração de DNA genômico de *Schistosoma mansoni* de 1 ng, porém não avaliou a técnica por meio de uma curva de sensibilidade analítica. Assim, observa-se que não há muitos estudos relacionados à liofilização do LAMP, principalmente para a esquistossomose. Logo, são necessárias adaptações de protocolos que obtiveram uma boa sensibilidade para a detecção do *Schistosoma mansoni*, com o objetivo de se alcançar um melhor resultado, principalmente para a identificação de pessoas infectadas com baixa carga parasitária e residentes de áreas endêmicas.

Quando realizado pela segunda vez, em duplicata, o SmITS-LAMP liofilizado apresentou o mesmo resultado para o S1 (1 ng). O autor García-Bernalt et al. (2019), na Espanha, quando avaliou o LAMP liofilizado para a esquistossomose, também fez o experimento em duplicata e ambos apresentaram resultados positivos, com uma sensibilidade analítica de 1 ng. Assim, destaca-se a importância da duplicata, a qual demonstra que o teste realmente funciona, o que ajuda a destacar a reprodutibilidade da técnica realizada.

A liofilização dos reagentes do SmITS-LAMP, em microtubos de 200 µL e de 1,5 mL, foi realizada com o objetivo de identificar qual seria a melhor forma de preparar o Master Mix liofilizado: com todos os Master Mix dos pontos da curva em um único tubo de 1,5 mL para depois da ressuspensão distribuir 50 µL em cada microtubo da curva ou liofilizar os reagentes de cada ponto da curva direto nos microtubos de 200 µL. Com isso, apenas o experimento realizado com o Master Mix liofilizado direto nos microtubos de 200 µL apresentaram positividade, no S1, de 100 pg, 10 pg e 1 fg. Já García-Bernalt et al. (2019) na Espanha, obtiveram um resultado diferente, visto que realizaram a liofilização dos reagentes em microtubos de 1,5 mL e obtiveram resultados positivos. Beissner et al. (2015), em Gana, também realizaram a liofilização dos reagentes em microtubos de 1,5 mL e obtiveram resultados positivos para o LAMP liofilizado. Isso remete a questão dos diferentes resultados no LAMP, visto que as diferenças de protocolo são as responsáveis pelas variações dos resultados obtidos. Ademais, a realização da liofilização diretamente nos microtubos de 200 µL agiliza o teste, visto que após a ressuspensão dos reagentes liofilizados e a adição da amostra, o microtubo vai direto para o Termociclador. Além disso, também evita o contato com os reagentes do Master Mix, o que pode ajudar a minimizar a possível contaminação do teste.

Por fim, na avaliação do SmITS-LAMP não liofilizado ao longo do tempo, o S1 manteve sua estabilidade por 90 dias quando congelado a -25°C . Já Thekisoie et al. (2009), no Japão, analisou a estabilidade do LAMP para a detecção do DNA genômico do *Trypanosoma brucei brucei* nas temperaturas 25°C , 37°C e -20°C e atingiu uma sensibilidade analítica de 0,01 pg quando armazenado nas temperaturas de 25°C e -20°C . Ademais, García-Bernalt et al. (2019) realizaram essa avaliação da estabilidade com o LAMP já liofilizado, o qual se manteve estável na geladeira por até 5 meses. Assim, observa-se que são necessários mais estudos com o SmITS-LAMP para que este alcance uma melhor estabilidade em temperatura ambiente, o qual possibilita que o teste seja utilizado como *point-of-care* e que seja adaptado para o formato de kit diagnóstico. Ademais, o teste também pode ser realizado com o LAMP liofilizado, o que possibilitaria uma estabilidade por um tempo mais longo.

6 CONCLUSÃO

- Conclui-se que são necessárias mais etapas de otimização para que a sensibilidade do SmITS LAMP Liofilizado alcance um desempenho similar ao sistema não liofilizado.
- A avaliação do mix não liofilizado ao longo do tempo também apresentou alguns problemas, como positividade alternadas ao longo das curvas e alguns casos de positividade no controle negativo o que reflete a baixa reprodutibilidade da técnica.
- Ademais, apesar de o Sistema 1 ter apresentado um bom resultado, é necessária a realização de mais ensaios e estudos para que o sistema possa ser melhorado e fique mais estável.

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.
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.
3. AGEL, Esra; SAGCAN, Hasan. Optimization of lyophilized LAMP and RT-PCR reaction mixes for detection of tuberculosis. **The EuroBiotech Journal**, 2020, 4.4: 230-236.
4. ALLAM, A. F. et al. Performance of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Schistosoma mansoni* infection compared with Kato–Katz and real-time PCR. **Journal of Helminthology**, v. 96, p. e28, 2022.
5. ANDRADE, Z. A. Shistosomal Hepatopathy. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**. n. 99, p. 51-57, 2004.
6. AQUAPORTAIL. **Biomphalaria glabrata**. Aquaportail, 2012. Disponível em:< <https://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-2564-biomphalaria-glabrata.html>>. Acesso em: 20 mar 2023.
7. BARBOSA, Constança Simões et al. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta tropica**, v. 164, p. 10-16, 2016.
8. BARRETO, Ana Virgínia Matos Sá et al. Análise da positividade da esquistossomose mansoni em Regionais de Saúde endêmicas em

- Pernambuco, 2005 a 2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, p. 87-96, 2015.
9. BEISSNER, Marcus, et al. Loop-mediated isothermal amplification for laboratory confirmation of Buruli ulcer disease—towards a point-of-care test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2015, 9.11: e0004219.
 10. BERHE, Nega et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta tropica**, v. 92, n. 3, p. 205-212, 2004.
 11. BEZERRA, F. S. M.; FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C. Moluscos transmissores do *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. p. 247-256.
 12. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica**. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. 178 p.
 13. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni**: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
 14. CALASANS, T. A. S. et al. Socioenvironmental factors associated with *Schistosoma mansoni* infection and intermediate hosts in an urban area of northeastern Brazil. **PLoS ONE**. 13(5): e0195519, 2018.
 15. CAO, Heping; SHOCKEY, Jay M. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 50, p. 12296-12303, 2012.
 16. CARNEIRO, T.R. 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 108, p.1037–1044, 2013.
17. CARTER, C. et al. (2017). Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA. **Journal of virological methods**, 244, 32-38.
18. CARVALHO, G.C.D. et al. Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 107, p.899–902, 2012.
19. CARVALHO, G.C.D. et al. Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 107, p.899–902, 2012.
20. CARVALHO, OS; COELHO, PMZ, LENZI, HL. Orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.
21. CHEN, H. W., & CHING, W. M. (2017). Evaluation of the stability of lyophilized loop-mediated isothermal amplification reagents for the detection of *Coxiella burnetii*. **Heliyon**, 3(10), e00415.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
25. DE MENDONÇA, Ivete Lopes et al. Técnicas biomoleculares aplicadas em hospedeiros intermediários da esquistossomose. **Ciência Animal**, v. 32, n. 2, p. 149-158, 2022.
26. DOMINGUES, A. L. C.; FERRAZ, A. A. B. Doença Hepática Esquistossomótica. In: COELHO, J. C. et al. **Aparelho Digestivo: clínica e cirurgia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 1559-1575.
27. DOS SANTOS SOUSA, Darlesson Geovani et al. Desafios e perspectivas do diagnóstico da esquistossomose mansônica no Brasil: revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, p. e6430-e6430, 2021.
28. ENGVALL, E. and PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. **Immunochemistry**, 1971, v. 8, p. 871-874.
29. 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.
30. ENK, M.J. et al. Diagnostic Accuracy and Applicability of a PCR System for the Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in Human Urine Samples from an Endemic Area. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, 2012.
31. ENK, Martin Johannes; OLIVEIRA E SILVA, Guilherme; RODRIGUES, Nilton Barnabé. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38947, 2012.

32. 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.
33. FERNANDES, Marconi Leão. Esquistossomose: investigação sobre o conhecimento da doença entre trabalhadores do setor turístico e frequentadores de coleções hídricas em um município da Estrada Real, Minas Gerais. 2019.
34. FERNÁNDEZ-SOTO P, et al. Molecular Markers for Detecting *Schistosoma* Species by Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Disease Markers**. 2020, v. 2020, n. 8042705.
35. FERNANDEZ-SOTO, Pedro et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3126, 2014.
36. FRAZÃO, Monique. **Contaminação em ciclo**. Disponível em: <<https://radis.ensp.fiocruz.br/index.php/home/reportagem/contaminacao-em-ciclo>>. Acesso em: 27 dez. 2022.
37. FUSS, Antje et al. Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202499, 2018.
38. 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.
39. 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.

40. GOMES, Elaine Christine Souza; JÚNIOR, Walter Lins Barbosa; DE MELO, Fábio Lopes. Evaluation of SmITS1-LAMP performance to diagnosis schistosomiasis in human stool samples from an endemic area in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 242, p. 108389, 2022.
41. GOMES, Elaine CS; DOMINGUES, Ana Lúcia C.; BARBOSA, Constança S. **Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica**. In: Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. 2017. p. 152-152.
42. GRAY, D.J. et al. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ**, London, v. 342: 2011.
43. GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Nested polymerase chain reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 2, p. pdb. prot095182, 2019.
44. GUEGAN, H., et al. Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2019, v. 13, n. 9, p. e0007711.
45. HAILEGEBRIEL, Tamirat; NIBRET, Endalkachew; MUNSHEA, Abaineh. Prevalence of *Schistosoma mansoni* and associated risk factors in human and biomphalaria snails in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Acta Parasitologica**, p. 1-18, 2021.
46. HAMBURGER, J. et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, p. 872-876, Dez. 1998b.
47. HAMBURGER, J. et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, p. 872-876, Dez. 1998b.

48. HAMBURGER, J. et al. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 468-473, Set. 1998a.
49. HAMBURGER, J. et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification suitable for molecular monitoring of schistosome-infected snails in field laboratories. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 88, n. 2, p.344-51, Fev. 2013.
50. HAMBURGUER, J. et al. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species specific probe. **Mol Biochem Parasitol.** Amsterdam, v. 44, p. 73–80, 1991.
51. HAYASHIDA, Kyoko et al. Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for Human African Trypanosomiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003578, 2015.
52. HOCKLEY DJ. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Advances in Parasitology**, 1973, v. 11, n. 0, p. 233-305.
53. HOTEZ, Peter J. Global urbanization and the neglected tropical diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005308, 2017.
54. 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.
55. JAUREGUIBERRY, S.; PARIS, L.; CAUMES, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clinical Microbiology Infections**, v. 16, n. 3, p. 225-231, 2010.

56. JUNIOR, José Max Barbosa de Oliveira; CALVÃO, Lenize Batista. **Ciências Biológicas: Campo promissor em pesquisa 3**. Ed 1. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020.
57. 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.
58. 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 São Paulo**, 1972, v. 14, n. 6, p. 397–400.
59. KATZ, Naftale et al. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses**. 2018.
60. LABARRE, Paul et al. A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity—toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19738, 2011.
61. LAMBERTON, Poppy HL et al. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for Schistosoma mansoni diagnosis pre-and post-repeated-praziquantel treatment. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3139, 2014.
62. LAMBERTUCCI, J. R. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional new tools. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 130-136, 2014.
63. LEITE, Fernanda Paini et al. Uso da PCR em tempo real para confirmação da doença residual mínima em pacientes curados da Leucemia Mielóide Crônica. An. Eletrônico do IX Encontro Int. **Produção Científica UniCesumar**, p. 4-8, 2015.

64. LINDHOLZ, Catieli Gobetti et al. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candéal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006274, 2018.
65. 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.
66. MARUSHCHAK, Lyudmyla V. et al. Development of a PCR Kit for Detection of *Coxiella burnetii* in Ukraine. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2020.
67. MCMANUS, Donald P. et al. Schistosomiasis. **Nature reviews Disease primers**, [s. l.], v. 4, ed. 13, p. 1-19, 9 ago. 2018.
68. MELO, A. L.; COELHO, P. A. Z. *Schistosoma manoni* e a esquistosomose. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. p. 225-245.
69. MELO, A. L.; PINTO, H. A. Helminths. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016. p. 215-223.
70. MELO, Fábio L. et al. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 11, p. 1049-1055, 2006.
71. 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.
72. 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.

73. NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**. 2000, v. 28, n. 12, p. E63.
74. OBENG, B. B. et al. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine samples from Ghana. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 102, n. 7, p. 625-633, 2008.
75. OKOYO, Collins et al. Comparing the performance of circulating cathodic antigen and Kato-Katz techniques in evaluating *Schistosoma mansoni* infection in areas with low prevalence in selected counties of Kenya: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2018.
76. OLIVEIRA, L.M. et al. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 68, p.416-421, 2010.
77. PAREDES, Helen et al. Spatial pattern, water use and risk levels associated with the transmission of schistosomiasis on the north coast of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, p. 1013-1023, 2010.
78. PENA, Heloisa B. et al. Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. 915-919, 1995.
79. PIERI, O. et al. Os moluscos transmissores e outros moluscos de importância médica. In: BARBOSA, C. S.; GOMES, E. C. S (Org.). **Manual Prático para o Diagnóstico e Controle da Esquistossomose**. Recife: Companhia Editora de Pernambuco, 2012. p. 53-67.

80. PONTES, Luís André; DIAS-NETO, Emmanuel; RABELLO, Ana. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 2, p. 157-162, 2002.
81. REY, L. **Parasitologia** 3ª. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001
82. REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 883 p.
83. RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
84. SANAR. **Vigilância em saúde**: Boletim esquistossomose. Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, 2017. Disponível em <http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/boletim_esquistossomose_2017_pdf.pdf>. Acesso em: 20 mar 2023
85. SAUCHA, Camylla Veloso Valença; SILVA, José Alexandre Menezes da; AMORIM, Liliane Barbosa. Condições de saneamento básico em áreas hiperendêmicas para esquistossomose no estado de Pernambuco em 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, p. 497-506, 2015.
86. SCHISTOSOMIASIS. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis#:~:text=Schistosomiasis%20is%20an%20acute%20and,expose%20them%20to%20infested%20water.>>. Acesso em: 20 dez. 2022.
87. SILVA-MORAES, Vanessa et al. Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity

- Schistosoma mansoni infections in endemic area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0006974, 2019.
88. SILVA-MORAES, V. et al. Diagnosis of Schistosoma mansoni infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 114: e180478, 2019.
89. STEINMANN, Peter et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.
90. THEKISOE, Oriel MM, et al. Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. **Journal of Veterinary Medical Science**, 2009, 71.4: 471-475.
91. 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.
92. VAN LIESHOUT, Lisette et al. Analysis of worm burden variation in human Schistosoma mansoni infections by determination of serum levels of 37 circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 5, p. 1336-1342, 1995.
93. VENGESAI, Arthur et al. Diagnostic performances of Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni recombinant proteins, peptides and chimeric proteins antibody based tests. Systematic scoping review. **Plos one**, v. 18, n. 3, p. e0282233, 2023.
94. WANDERLEY, Leandro Batista et al. Avaliação da técnica Nested-PCR no diagnóstico de Schistosoma mansoni em caramujos e amostras biológicas humanas. 2017. **Tese de Doutorado**.

95. 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.
96. WHO et al. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. **World Health Organization**, 2002.
97. 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 20 mar 2023.
98. WHO. Schistosomiasis. World Health Organization, 2023. Disponível em:< <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acesso em: 01 mar 2023.
99. WONG, Y.-P. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 3, p. 626-643, 2018.
100. 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.
101. ZHAO, G.H.; et al. Biotechnological advances in the diagnosis, species differentiation and phylogenetic analysis of *Schistosoma* spp. **Biotechnol. Adv.**, New York, v. 30, p.1381–1389, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer circunstanciado CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de kit baseado em LAMP-PCR para o diagnóstico da esquistossomose mansônica em áreas de baixa endemicidade

Pesquisador: ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 33600620.5.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.206.062

Apresentação do Projeto:

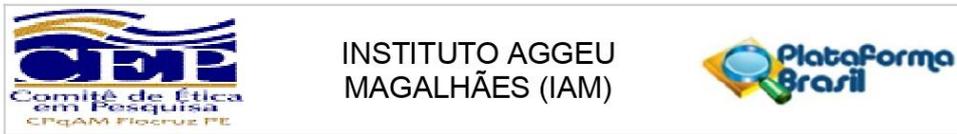
O projeto trata-se de um estudo experimental que tem por objetivo otimizar a técnica de diagnóstico molecular, SmMIT-LAMP, para detecção de infecção pelo *Schistosoma mansoni* a partir de amostras de fezes. Após otimização da técnica em laboratório, a mesma será testada em amostras de fezes de pacientes oriundos de áreas endêmicas. Segue abaixo um resumo do que será feito em cada etapa do estudo:

Objetivo 1 Otimizar e avaliar da extração de DNA pela técnica de Fenol/ Clorofórmio (verme adulto e em amostras de fezes).

Objetivo 2 Otimizar do sistema SmMIT-LAMP (variação da temperatura, tempo e concentração de Syber Green: I) através de uma curva de calibração; Liofilização da reação => SmMIT-LAMP -L; Avaliação de sensibilidade da SmMIT-LAMP -L em comparação com SmMIT-LAMP, PCR convencional e Nested PCR; Avaliação da especificidade da SmMIT -LAMP -L.

Objetivo 3 Avaliar o desempenho do SmMIT-LAMP-L ao longo do tempo. Após a otimização do SmMIT-LAMP-L, serão preparados e armazenados em temperatura ambiente 120 tubos com todos reagentes SmMIT-LAMP-L para posterior utilização. A finalidade deste teste é verificar o prazo de validade dos sistemas liofilizados. Do 1º ao 10º mês serão testados a eficiência de 10 tubos, e posteriormente, no 13º e 15º mês mais 10 tubos serão avaliados. Obs.: Caso um dos sistemas deixem de funcionar os testes posteriores serão interrompidos.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.206.062

Objetivo 4 Realizar o mapeamento e cadastramento da população; Realização do inquérito coproscópico (Kato-Katz); Determinação da prevalência, carga parasitária e forma clínica da doença; Extração de DNA das amostras de fezes humanas (a partir da padronização obtida no objetivo 1); Analisar as amostras de DNA extraídas através do kit SmMIT-LAMP-L e outros métodos PCR; Comparação dos resultados do kit SmMIT-LAMP-L com outro método PCR; Determinar a sensibilidade e especificidade do SmMIT-LAMP-L frente ao Kato-Katz e outro método de PCR. ANÁLISE DOS RESULTADOS a partir dos resultados do inquérito parasitológico, do SmMIT-LAMP, do SmMIT-LAMP-L e de outros tipos de PCR: convencionais, Nested PCR e STNPCR (a ser definido), os dados serão analisados em termos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e eficiência, com intervalos de confiança de 95% (tabela 1).

Será realizado um inquérito coproscópico populacional em uma localidade de baixa endemicidade na Zona da Mata de Pernambuco, região sabidamente endêmica para esquistossomose. Será escolhido um município que apresente prevalência inferior a 10% em que a população não tenha sido submetida a tratamento em massa para esquistossomose nos últimos 5 anos.

Serão incluídos no projeto todos os moradores das localidades selecionadas que aceitarem participar da pesquisa, com o devido preenchimento e assinatura do TCLE e/ou TALE.

O único critério de exclusão é o fato do indivíduo não residir na localidade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver um kit diagnóstico baseado na técnica SmMIT-LAMP criada por Fernández-Soto et al. (2014) e validada por Gandasegui et al. (2018) para detecção da esquistossomose mansônica em pacientes oriundos de áreas endêmicas para doença.

Objetivo Secundário:

- Otimizar o método de extração de DNA de *S. mansoni* através da técnica de Fenol/ Clorofórmio para posterior utilização no SmMIT-LAMP.
- Otimizar a técnica SmMIT-LAMP com reagentes previamente liofilizados e avaliar sua sensibilidade com quantidades conhecidas de DNA genômico de *S. mansoni* em comparação a outros sistemas de PCR.
- Avaliar o desempenho do SmMIT-LAMP com reagentes liofilizados ao longo do tempo.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.206.062

- Realizar um projeto piloto para testar a eficiência do kit diagnóstico SmMIT-LAMP em área de baixa endemicidade para esquistossomose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos decorrentes da participação do voluntário nesta pesquisa são a possibilidade de constrangimento no momento da coleta e entrega das fezes e durante a realização das entrevistas, porém, asseguramos que serão tomados todos os cuidados necessários para que este fato não aconteça. Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos os que participarem da pesquisa.

Benefícios:

O indivíduo que permitir a participação nesta pesquisa, estará contribuindo para o melhor entendimento da doença e melhorias no diagnóstico mais assertivo. Além disso, ao realizar exames de fezes, o indivíduo receberá o resultado do mesmo e em caso de alguma alteração nos resultados será encaminhado para uma consulta médica e receberá orientações de higiene e métodos para evitar novas infecções.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de otimizar da técnica de diagnóstico molecular, SmMIT-LAMP. Será comparada a sensibilidade e especificidade do LAMP frente as técnicas de PCR convencionais, Nested PCR e STNPCR (serão utilizadas as mesmas amostras de DNA utilizadas na validação do LAMP). A partir dos resultados do inquérito parasitológico, do SmMIT-LAMP, do SmMIT-LAMP-L e de outros tipos de PCR: convencionais, Nested PCR e STNPCR (a ser definido), os dados serão analisados em termos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e eficiência, com intervalos de confiança de 95% (tabela 1). Os resultados obtidos serão analisados através do programa estatístico Epi-Info 7.

O material biológico será armazenado em biorrepositório do Instituto Aggeu Magalhães. Não haverá uso de dados secundários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de Rosto - sem pendências.
2. Projeto de pesquisa original na íntegra - sem pendências.
3. Orçamento Financeiro - sem pendências.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.206.062

4. Cronograma - sem pendências.
5. TCLE e TALE com as devidas garantias aos participantes - sem pendências.
6. Declaração de biorrepositório - sem pendências.
7. Declaração de compromisso - sem pendências
8. Carta de Anuência para inquérito parasitológico - Pendente - Fechando parceria de trabalho com o(s) município(s) onde será realizado o inquérito parasitológico. Pesquisadora se compromete em enviar a Carta de Anuência assim que acertar todos os detalhes da parceria.

Recomendações:

Entregas de relatórios parciais e final devem ser feitas via notificação. Os relatórios parciais devem ser apresentados, pelo menos, semestralmente. Qualquer alteração no protocolo no decorrer da pesquisa, como também mudança de equipe, devem ser informados via emenda. Todas as ações deve ser realizadas via Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências do parecer n. 4.154.289 foram atendidas, com exceção da definição dos municípios e anuências das respectivas prefeituras. Assim o protocolo está aprovado, devendo a pesquisadora só iniciar os inquéritos após o envio da Carta de Anuência do(s) município(s) onde será realizado o inquérito parasitológico, via notificação a esse CEP.

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

Considerações Finais a critério do CEP:

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.206.062

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1504321.pdf	17/07/2020 18:33:45		Aceito
Outros	Carta_resposta_14_07_20.pdf	17/07/2020 18:32:40	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_11_18_anos_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:29:55	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_7_10_anos_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:29:37	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Crianca_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:29:08	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adulto_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:27:58	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biorrepositorio_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:24:30	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_LAMP_CEP_Alteracoes_Includas_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:22:21	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_LAMP_CEP_AlteracoesDestacadas_17_07_20.pdf	17/07/2020 18:21:26	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Declaração do Patrocinador	termosDeConcessao.pdf	15/06/2020 14:37:00	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_15_06_20.pdf	15/06/2020 14:35:23	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_ASSINADA_2.pdf	15/06/2020 14:34:37	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_10_06_20.pdf	10/06/2020 12:07:46	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_7_10_anos_10_06_20.pdf	10/06/2020 11:41:43	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
Outros	Declaracao_Compromisso_Carta_Anuencia.pdf	20/03/2020 12:38:53	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Outros	Lattes_Elaine_CS_Gomes.pdf	20/03/2020	ELAINNE	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 4.206.062

Outros	Lattes_Elaine_CS_Gomes.pdf	11:31:17	DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_11_18_anos_LAMP_13_03_20.pdf	20/03/2020 11:23:46	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_7_10_anos_LAMP_13_03_20.pdf	20/03/2020 11:23:31	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_crianca_LAMP_13_03_20.pdf	20/03/2020 11:23:09	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adulto_LAMP_13_03_20.pdf	20/03/2020 11:22:52	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito
Declaração de concordância	Equipe_do_Projeto.pdf	20/03/2020 11:22:09	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_compromisso_relatorios.pdf	20/03/2020 11:21:05	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Cronograma	Cronograma_CEP.pdf	20/03/2020 11:10:36	ELAINNE CHRISTINE DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_LAMP_CEP_2020.pdf	20/03/2020 11:09:46	ELAINNE CHRISTINE DE SOUZA GOMES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 11 de Agosto de 2020

Assinado por:

**Maria Almerice Lopes da Silva
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br