



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

BÁRBARA SILVA GONZAGA

**APLICAÇÃO DE Sm1-7qPCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE  
*Schistosoma mansoni* EM MODELO MURINO COM  
INFECÇÃO CONTROLADA**

Recife  
2023

BÁRBARA SILVA GONZAGA

**APLICAÇÃO DE Sm1-7qPCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE  
*Schistosoma mansoni* EM MODELO MURINO COM  
INFECÇÃO CONTROLADA**

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: Dr<sup>a</sup> Elaine Christine de Souza Gomes

Co-orientador: Dr Walter Lins Barbosa Júnior

Recife  
2023

BÁRBARA SILVA GONZAGA

**APLICAÇÃO DE Sm1-7qPCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE  
*Schistosoma mansoni* EM MODELO MURINO COM  
INFECÇÃO CONTROLADA**

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Dr<sup>a</sup> Elaine Christine de Souza Gomes  
Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz - PE

---

Dr<sup>a</sup> Lívia Andressa Silva do Carmo  
Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz - PE

---

Dr. Fabio Lopes de Melo  
Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz - PE

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

Gonzaga, Bárbara Siva.

Aplicação de Sm1-7qPCR para detecção de DNA de Schistosoma mansoni em modelo murino com infecção controlada / Bárbara Siva Gonzaga. - Recife, 2023. 57 p. : il., tab.

Orientador(a): Elaine Christine de Souza Gomes

Coorientador(a): Walter Lins Barbosa Júnior

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

Inclui referências, anexos.

1. Esquistossomose. 2. Baixa endemicidade. 3. Extração de DNA. 4. Diagnóstico. 5. Carga parasitária. I. Gomes, Elaine Christine de Souza. (Orientação). II. Barbosa Júnior, Walter Lins. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

Dedico este trabalho à minha mãe, que se fez presente mesmo na distância.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a elaboração deste trabalho, primeiramente, à minha mãe Shirley Gonzaga. À ela quem devo os valores morais e profissionais que pratico todos os dias. Que eu possa ser o espelho da sua dedicação e da sua persistência.

Agradeço ao meu pai Emerson, por me aplaudir sempre da primeira fileira, e ao meu irmão Heitor, por me achar incrível mesmo quando eu não achava. De fato, é minha pessoa favorita no mundo.

À minha avó Terezinha, que é sinônimo de cuidado, sempre me acolheu com amor quando voltava para São José e me fazia cogitar não voltar para Recife. Ao meu avô, Silas, que é o primeiro pernambucano da minha vida e a quem admiro grandemente. Guardei o senhor no coração durante toda minha jornada no Nordeste.

Agradeço aos amigos que fiz na graduação, principalmente à Eduarda, Sharla, Bárbara e Sandro, que compartilharam comigo a experiência de estar longe de casa. Agradeço também, à minha querida amiga e colega de apartamento, Ana Mota, por cada conselho e momentos vividos.

Agradeço a Bruno Henrique, que sempre apoiou qualquer loucura minha e me ensinou a ser paciente e jovem. A vida não precisa ser formal e entendi isso com você.

Sou grata, essencialmente, à equipe do Laboratório de Referência em Esquistossomose por compartilhar os conhecimentos necessários para a elaboração desse projeto. Existem aprendizados que apenas a vivência oferece, e por isso sou grata aos técnicos Barnabé, Fatinha e Fernando. Nunca serão esquecidas todas as risadas que demos, enquanto trabalhávamos. Agradeço ao meu trio da Biologia Molecular, Eduardo e Natália, que sempre foram compreensivos e amigos. Vocês são o meu “*dream team*”.

Agradeço grandemente ao meu coorientador, Dr. Walter Lins Barbosa Júnior, que me ensinou do zero e me deu o mais importante: a autonomia e confiança necessária para realizar meus experimentos. O conhecimento ninguém é capaz de nos tirar, e agradeço por isso. À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Elaine Christine de Souza Gomes, agradeço por me receber na Fiocruz Pernambuco e nortear minha vida acadêmica. A senhora me disse quando me conheceu, que muitas pessoas gostariam de ter a oportunidade que temos e fiz questão de honrar com o meu

trabalho. Por fim, agradeço aos órgãos de fomento, CNPq e FACEPE, e ao Instituto Aggeu Magalhães, que garantiram a infraestrutura necessária para contribuirmos com a ciência brasileira por meio desta monografia.

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo  
para todo propósito debaixo do céu.”  
(Eclesiastes 3:1)

GONZAGA, Bárbara Silva. **Aplicação de Sm1-7qPCR para detecção de DNA de *Schistosoma mansoni* em modelo murino com infecção controlada.** 2023. 57 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## RESUMO

A esquistossomose é uma parasitose ocasionada pelo trematódeo *Schistosoma* spp., sendo a espécie *S. mansoni* prevalente no Brasil. O diagnóstico “padrão-ouro” para a doença é o teste parasitológico de Kato-Katz (KK), que identifica infectados e sua carga parasitária, porém apresenta pouca sensibilidade em áreas de baixa endemicidade. Por isso, o grande problema no contexto da saúde pública é a carência de métodos diagnósticos sensíveis que identifiquem pacientes assintomáticos e falso-negativos. Diante disso, a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) pode ser promissora nessas localidades, devido à alta sensibilidade para detecção de pequenas quantidades de material genético. Para tanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da Sm1-7qPCR na detecção de DNA de *Schistosoma mansoni* em amostras de camundongos. Assim, foram recolhidas individualmente, após 42 dias de infecção, as fezes de 15 camundongos expostos à infecção por *S. mansoni* e de 15 camundongos não infectados, estabelecidos como “não expostos”. As 30 amostras foram submetidas às técnicas de Hoffman e KK, e também foram utilizadas para comparação de dois métodos de extração de DNA: o *kit* comercial QIAamp Power Fecal® e o método *in house* de fenol:clorofórmio (FC); as análises das extrações de DNA foram realizadas por meio da absorbância A260/280, pelo espectrofotômetro. Além disso, foram realizadas diluições seriadas em fator 10 de DNA de vermes de *S. mansoni* para aplicação no sistema Sm1-7qPCR, a fim de se obter a sensibilidade analítica da técnica. O sistema de qPCR otimizado e a *Nested-PCR* foram utilizados sobre as amostras de DNA das fezes. Os resultados obtidos pelos testes diagnósticos foram analisados pelo *software* Stata 14, para obtenção dos dados epidemiológicos e de concordância (kappa). Os resultados revelaram melhores variações de absorbância (entre 1,87 e 1,9) para as DNAs extraídas por meio do *kit* comercial, sendo estes selecionados para aplicação no sistema Sm1-7qPCR. A otimização do sistema de qPCR obteve Ct de corte 35,32 para 1 fg/μL. A sensibilidade epidemiológica foi de 73,3% para Kato-Katz; 66,7% para Hoffman; e o mesmo valor de 86,7% para *Nested-PCR* e qPCR. A concordância comparada à infecção por cercária foi ótima para Sm1-7qPCR ( $K = 0,867$ ;  $p < 0,001$ ). Diante disso, as extrações obtidas por meio de *kit* comercial devem ser priorizadas para garantir o bom desempenho das técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico. Ademais, a Sm1-7qPCR se revelou como uma ferramenta útil para aplicação no diagnóstico da esquistossomose, uma vez que detectou a presença de *S. mansoni* em amostras biológicas em 13 dos 15 camundongos infectados.

**Palavras-chave:** Esquistossomose. Baixa endemicidade. Extração de DNA. Diagnóstico. Carga parasitária.

GONZAGA, Bárbara Silva. **Application of Sm1-7qPCR for detection of *Schistosoma mansoni* DNA in a murine model with controlled infection.** 2023. 57 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasite caused by the trematode *Schistosoma* spp., the species *S. mansoni* being prevalent in Brazil. The “gold standard” diagnosis for the disease is the Kato-Katz (KK) parasitological test, which identifies infected people and their parasitic load, but has little sensitivity in areas of low endemicity. Therefore, the major problem in the context of public health is the lack of sensitive diagnostic methods that identify asymptomatic and false-negative patients. Given this, real-time polymerase chain reaction (qPCR) may be promising in these locations due to the high sensitivity for detecting small amounts of genetic material. Therefore, the objective of this study was to evaluate the applicability of Sm1-7qPCR in detecting *Schistosoma mansoni* DNA in mouse samples. Thus, feces were collected individually, after 42 days of infection, from 15 mice exposed to *S. mansoni* infection and from 15 uninfected mice, established as “not exposed”. The 30 samples were subjected to the Hoffman and KK techniques, and were also used to compare two DNA removal methods: the commercial QIAamp Power Fecal<sup>®</sup> kit and the in-house phenol:chloroform (FC) method; DNA extraction analyzes were carried out using absorbance A<sub>260/280</sub>, using a spectrophotometer. In addition, serial dilutions of *S. mansoni* worm DNA were carried out in factor 10 for application in the Sm1-7qPCR system, in order to obtain the analytical sensitivity of the technique. The optimized qPCR system and Nested-PCR were used on stool DNA samples. The results obtained by the diagnostic tests were analyzed using Stata 14 software, to obtain epidemiological and agreement data (kappa). The results revealed better absorbance variations (between 1.87 and 1.9) for the DNAs extracted using the commercial kit, which were selected for application in the Sm1-7qPCR system. The optimization of the qPCR system obtained a cutoff Ct of 35.32 for 1 fg/μL. Epidemiological sensitivity was 73.3% for Kato-Katz; 66.7% for Hoffman; and the same value of 86.7% for Nested-PCR and qPCR. The agreement compared to Cercariae infection was excellent for Sm1-7qPCR ( $K = 0.867$ ;  $p < 0.001$ ). Therefore, extractions obtained using a commercial kit must be prioritized to ensure the good performance of molecular techniques applied to diagnosis. Furthermore, Sm1-7qPCR proved to be a useful tool for use in the diagnosis of schistosomiasis, as it detected the presence of *S. mansoni* in biological samples in 13 of the 15 infected mice.

**Key words:** Schistosomiasis. Low endemicity. DNA extraction. Diagnosis. Parasite load.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição da prevalência da esquistossomose	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> – Positividade para esquistossomose no Brasil entre 2010 e 2015	<b>16</b>
<b>Figura 3</b> – Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	<b>18</b>
<b>Figura 4</b> – Esquistossomose crônica ativa e tardia estabelecida	<b>22</b>
<b>Figura 5</b> – Técnica parasitológica de Hoffman, Pons e Janer	<b>23</b>
<b>Figura 6</b> – Técnica parasitológica de Kato-Katz	<b>23</b>
<b>Figura 7</b> – Teste rápido Schisto POC-CCA™ para diagnóstico imunológico de esquistossomose	<b>25</b>
<b>Figura 8</b> – Esquema representativo da técnica de PCR em tempo real baseada na utilização de corantes ligantes de dupla fita de DNA	<b>27</b>
<b>Figura 9</b> – Esquema representativo da técnica de PCR em tempo real baseada em oligonucleotídeos marcados com fluoróforo	<b>28</b>
<b>Figura 10</b> – Representação do gráfico de amplificação de PCR em tempo real	<b>29</b>
<b>Figura 11</b> – Gel de agarose (2%) com o resultado de Nested-PCR do DNA das amostras de fezes de camundongos não infectados por <i>S. mansoni</i> e extraídas por fenol:clorofórmio	<b>35</b>
<b>Figura 12</b> – Gel de agarose (2%) com o resultado de Nested-PCR do DNA das amostras de fezes de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e extraídas por fenol:clorofórmio	<b>36</b>
<b>Figura 13</b> – Gel de agarose (2%) com o resultado de Nested-PCR do DNA das amostras de fezes de camundongos não infectados por <i>S. mansoni</i> e extraídas por kit comercial	<b>36</b>
<b>Figura 14</b> – Gel de agarose (2%) do resultado de Nested-PCR do DNA das amostras de fezes de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e extraídas por kit comercial	<b>37</b>
<b>Figura 15</b> – Sensibilidade analítica do sistema Sm1-7qPCR	<b>40</b>

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> – Modelo esquemático para cálculo dos parâmetros utilizados para validação do sistema qPCR	<b>33</b>
<b>Quadro 2</b> – Escala de concordância do Kappa ( $K$ )	<b>34</b>
<b>Tabela 1</b> – Concentração e pureza do DNA a partir da extração in house e por <i>kit</i> comercial	<b>37</b>
<b>Tabela 2</b> – Apresentação do resultado dos testes parasitológicos e moleculares dos camundongos infectados e não infectados	<b>40</b>
<b>Tabela 3</b> – Resultados positivos obtidos por meio do ensaio de Sm1-7qPCR, juntamente com os valor de Ct obtidos na amostragem de camundongos infectados	<b>42</b>
<b>Tabela 4</b> – Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN apresentadas pelos ensaios com infecção controlada de camundongos com cercárias de <i>S. mansoni</i>	<b>42</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	14
2.2 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO .....	17
2.3 HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO .....	19
2.4 FISIOPATOLOGIA .....	20
2.5 DIAGNÓSTICO .....	22
2.5.1 Diagnóstico Parasitológico .....	22
2.5.2 Diagnóstico Imunológico .....	24
2.5.3 Diagnóstico Molecular .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1 DESENHO DE ESTUDO .....	30
4.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	30
4.3 MÉTODOS MOLECULARES .....	31
4.3.1 Nested-PCR .....	31
4.3.2 Técnica Reação De Polimerase em Cadeia Em Tempo Real (Sm1-7qPCR) .....	32
4.4 ANÁLISE DE RESULTADO .....	33
4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>55</b>
ANEXO A – Cópia do parecer do Comitê de Ética No Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM) .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária ocasionada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma sp.*, cuja forma adulta habita os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo (POSADA-MARTÍNEZ, 2022). A doença é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das 20 doenças negligenciadas (WHO, 2020). O agente etiológico *S. mansoni* é prevalente na América Latina em países como Brasil, Venezuela, Porto Rico, Antilhas e Suriname (VITORINO *et al.*, 2012). Na América Latina, infecta aproximadamente 1,8 milhões de indivíduos e expõe 30 milhões ao risco de contrair a doença (NOYA, 2015).

No contexto nacional, a manutenção da transmissão desta parasitose e sua expansão para novos territórios é dada pela manutenção de áreas endêmicas, as quais resistem às políticas de prevenção, controle e tratamento, especialmente na região Nordeste, onde ainda é prevalente (GOMES *et al.*, 2014; NASCIMENTO; MEIRELLES, 2020; NOYA, 2015; SOBRINHO *et al.*, 2020).

O método diagnóstico padrão-ouro para a esquistossomose em todo o mundo é o teste parasitológico de fezes Kato-Katz (KK), que não apenas identifica indivíduos infectados, mas também determina sua carga parasitária (MCMANUS *et al.*, 2018). Trata-se de um método diagnóstico que apresenta alta especificidade; entretanto, sua sensibilidade depende da carga parasitária do hospedeiro, decaindo em pacientes com baixas cargas parasitárias (LEVECKE *et al.*, 2011; EASTON *et al.*, 2016).

O grande problema do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), no contexto da Saúde Pública, é a ausência de métodos diagnósticos sensíveis em áreas de baixa endemicidade, pois inúmeras ações do PCE reduziram a gravidade da doença, sua prevalência e incidência em áreas endêmicas. A partir da limitação pela carência de métodos diagnósticos de maior sensibilidade, há a manutenção de poucos indivíduos infectados, com baixa carga parasitária e, geralmente, assintomáticos, os quais favorecem a manutenção da transmissão nas áreas (BRASIL, 2014).

Diante de tal problemática, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) tem se revelado eficiente. Trata-se de uma técnica capaz de quantificar e monitorar a reação de amplificação de sequências de DNA (DUNN *et al.*, 2020; FREDRICKS, REALMAN, 1999). Dentre as possibilidades diagnósticas existentes, a

técnica se destaca por ser capaz de identificar a presença de DNA do parasito mesmo frente a baixa a carga parasitária e em pequenas quantidades de amostra. Métodos como os de imunoenaios compartilham da eficiência na detecção, entretanto, apresentam resultados falso-positivos associados à memória imunológica e a reações cruzadas com outros parasitas (BELIZÁRIO et al., 2022).

Os sistemas de PCR vêm sendo desenvolvidos como método diagnóstico de diversas helmintíases, identificando infecções causadas por *Schistosoma spp.* (OBENG et al., 2008; ESPÍRITO-SANTO et al., 2014; CUNNINGHAM et al., 2018), *Strongyloides stercoralis* (VERWEIJ et al., 2010), *Trichuris trichiuria* (LIU et al., 2013) e *Ascaris lumbricoides* (WIRIA et al., 2010). Estas técnicas representam uma alternativa diagnóstica mais sensível, principalmente em localidades com baixas cargas parasitárias nos indivíduos doentes, o que aumenta a chance de falso-negativos pelo método Kato-Katz (AL-SHEHRI et al., 2010).

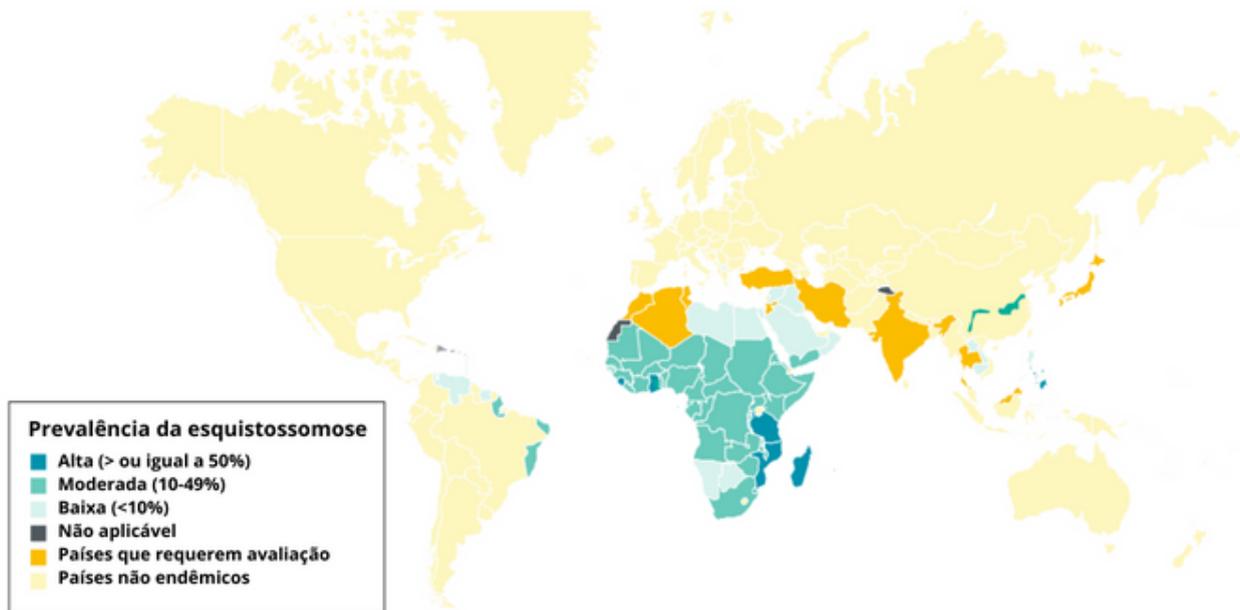
A partir disso, a utilização de métodos moleculares para diagnóstico de doenças infecciosas é necessária, principalmente em áreas de baixa endemicidade, devido sua alta sensibilidade para detecção de pequenas quantidades de material genético (CREGO-VICENTE et al., 2021; POMARI et al., 2019). Ademais, o estabelecimento da PCR em tempo real como método de diagnóstico para esquistossomose possibilitaria a mensuração do grau de infecção e auxiliaria ações no programa de controle da doença.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 EPIDEMIOLOGIA**

A esquistossomose é uma doença parasitária prevalente em regiões tropicais e subtropicais. Relacionada de maneira direta com saneamento básico precário e com acesso à água potável, é endêmica em 78 países (ROSS *et al.*, 2002) (Figura 1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas e 700 milhões estejam expostas ao risco de contrair a doença. Como consequência, a doença é a segunda parasitose com maior impacto socioeconômico, com perda de 2,5 milhões de anos de vida perdidos por incapacidade (DALYs) (WHO, 2021).

**Figura 1:** Distribuição da prevalência da esquistossomose.

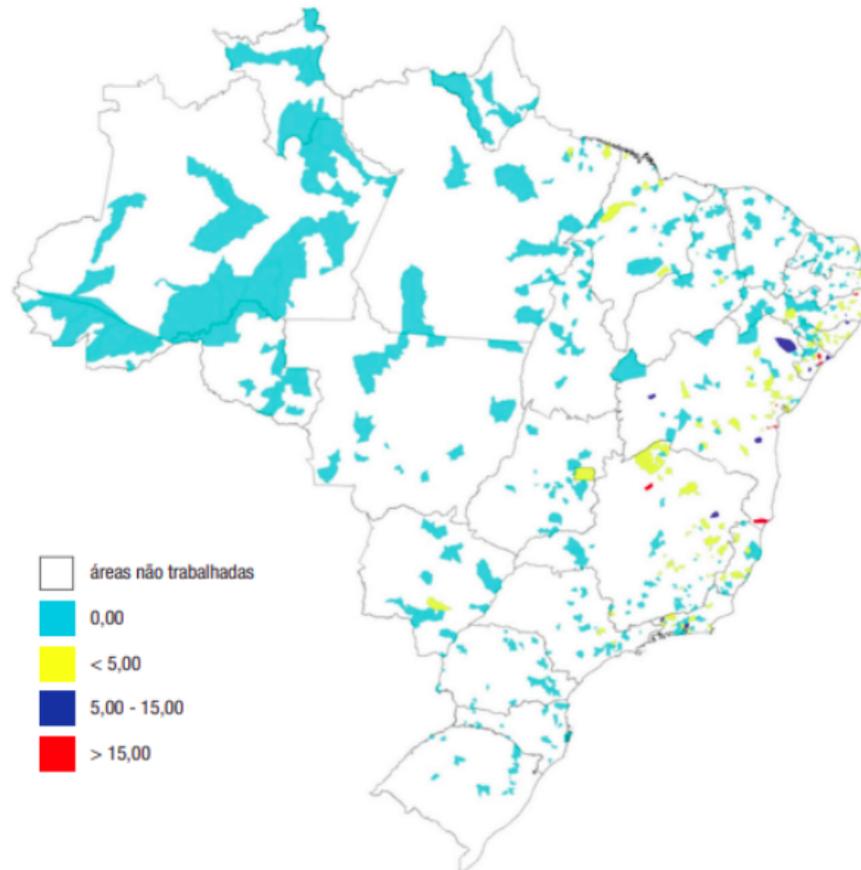


**Fonte:** Adaptado de McManus et al. (2018).

No Brasil, as espécies parasitas de humanos foram introduzidas ao território no período escravocrata (COUTINHO et al., 1993; SANTOS et al., 2001). No entanto, apenas o *S. mansoni* se estabeleceu, adaptando-se ao hospedeiro intermediário. A continuidade da disseminação mundial da doença é dada pela imigração de pessoas provenientes de regiões tropicais (ROSS et al., 2002).

A presença da parasitose no Brasil ocorre, principalmente, nas regiões Nordeste e Sudeste do país, mais especificamente nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Maranhão, Espírito Santo, e Minas Gerais, sendo estas áreas endêmicas (BRASIL, 2022) (Figura 2). O controle e ações de vigilância nas áreas endêmicas realiza-se por meio do Sistema de Informações do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (SISPCE) (BRASIL, 2014).

**Figura 2:** Positividade para esquistossomose no Brasil entre 2010 e 2015.



Fonte: Katz (2018).

O Estado de Pernambuco se destaca pela elevada prevalência, sendo 101 (54,6%) municípios endêmicos e 35 (18,9%) considerados vulneráveis para a doença (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO, 2023). A endemia histórica do estado se estabeleceu nas zonas rurais e os focos da parasitose se disseminaram para regiões litorâneas, devido ao êxodo de trabalhadores rurais infectados que agem como parte importante da manutenção do ciclo biológico do *S. mansoni* (BARBOSA, SILVA, BARBOSA, 1996; BARBOSA et al., 1998; BARBOSA et al., 2000). No ano de 2022, os indivíduos com carga parasitária baixa representaram 83,3% dos casos positivos no estado (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO, 2023). Além disso, algumas regiões como o Balneário de Porto de Galinhas (Ipojuca - PE), apresentaram redução de prevalência no período entre 2000 e 2012, devido ao investimento em urbanização e em saneamento básico (GOMES et al., 2012). A dinâmica do cenário da esquistossomose, perante a Saúde Pública do Estado de Pernambuco, estabelece diferentes desafios a serem enfrentados pelo Programa de Controle da

Esquistossomose (PCE), como a carência de técnicas de maior sensibilidade para a detecção de indivíduos doentes em áreas de baixa endemicidade (BRASIL, 2014).

## 2.2 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO

No filo Platyhelminthes, o gênero *Schistosoma* é responsável por causar a parasitose intravascular, denominada esquistossomose e de maneira popular, "barriga d'água". Em humanos, as espécies infectantes são: *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. mansoni* (NEVES, 2016).

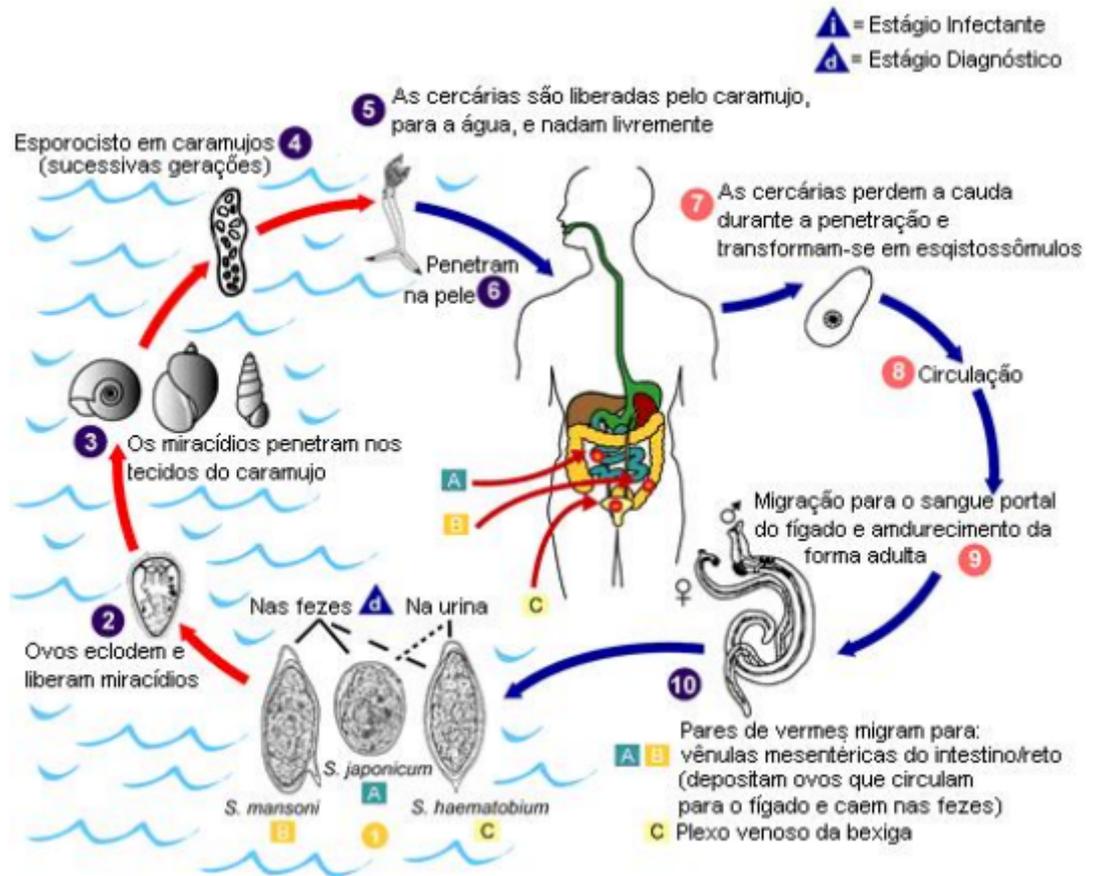
A morfologia do parasito diverge ao longo do seu ciclo biológico. O macho possui duas ventosas (oral e acetábulo) e em sua face posterior, encontra-se dobras longitudinais formando o canal ginecóforo. Já a fêmea, é mais longa, também possui ventosas e coloração mais escura. Na vida adulta, é comumente encontrada dentro do canal ginecóforo do macho, onde acontece a reprodução sexuada (NEVES, 2016).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é classificado como heteroxeno (Figura 3), envolvendo uma fase no ser humano, que atua como hospedeiro definitivo (fase sexuada), e outra no caramujo, que age como hospedeiro intermediário (fase assexuada). Inicia-se com a postura dos ovos no 35º dia após a infecção, na submucosa das veias mesentéricas de seres humanos, seus hospedeiros definitivos. Na espécie *S. mansoni*, os ovos possuem formato oval com espícula lateral e, com a maturação, observa-se dentro o miracídio - forma infectante para o hospedeiro intermediário. Dentre os 400 ovos por dia que são ovipositados pela fêmea, metade alcançam a luz intestinal para restabelecer o ciclo de infecção. O deslocamento até o meio externo ocorre em seis dias, caso supere 20 dias, os ovos tornam-se inviáveis (MCMANUS et al., 2018; NEVES, 2016).

O miracídio gerado é morfologicamente cilíndrico e ciliado para movimento aquático. Dentro de fontes de água doce, influenciada pela temperatura, ocorre a eclosão do ovo e, após 8 horas, o miracídio realiza a penetração no molusco (hospedeiro intermediário), por meio de uma papila apical com glândulas adesivas. A associação de movimentos giratórios e enzimas proteolíticas presentes nas glândulas, favorece o início da infecção no caramujo a partir do epitélio subtegumentar. Após esta etapa, ocorre a multiplicação assexuada dos miracídios, que passam por três estágios de desenvolvimento (esporocistos I, II e III), resultando

na formação das cercárias, que correspondem forma infectante para os seres humanos (MCMANUS et al., 2018; NEVES, 2016).

**Figura 3:** Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Adaptado de *Center of Disease Control and Prevention* (CDC). Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.html>.

Mediante estímulos como luz e calor, as cercárias emergem do caramujo e permanecem no meio aquático até encontrarem seu hospedeiro definitivo. Em resposta aos sinais químicos, as cercárias penetram ativamente na pele humana, a partir de mecanismos mecânicos e enzimáticos. Durante esse processo, elas perdem sua cauda bifurcada e assumem a forma de esquistossômulos. Estes alcançam o lado direito do coração por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos e, posteriormente, atravessam os pulmões antes de se estabelecerem nas veias do sistema porta-hepático, onde completam seu desenvolvimento. Os vermes adultos se acasalam, migrando então para a veia mesentérica inferior, e é nesse momento que a fêmea inicia a oviposição, encerrando, assim, seu ciclo evolutivo (REY, 2015).

### 2.3 HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

O *S. mansoni* tem como hospedeiro intermediário moluscos que pertencem ao filo Mollusca e à classe Gastropoda, compreendendo três ordens: Stylommatophora, Systellommatophora e Basommatophora. Esta última é hospedeira de trematódeos e nematódeos e inclui cinco famílias de importância médica e veterinária: Chiliniidae, Lymnaeidae, Physidae, Ancyliidae e Planorbidae (NEVES, 2016).

A família Planorbidae abrange o gênero *Biomphalaria*, que possui grande importância epidemiológica no Brasil, uma vez que inclui três espécies naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (BEZERRA; FERNANDEZ; THIENGO, 2016).

No Brasil, as espécies de *Biomphalaria* que atuam como hospedeiros intermediários estão amplamente distribuídas. Pelo menos uma das três espécies já foi registrada em 24 dos 26 estados brasileiros, além do Distrito Federal, não havendo registro de ocorrência nos estados do Amapá e Rondônia. Portanto, a distribuição geográfica da esquistossomose mansoni no Brasil está diretamente relacionada à presença desses caramujos, que estão amplamente disseminados no país e adaptados a diferentes condições ambientais e climáticas (BEZERRA; FERNANDEZ; THIENGO, 2016).

*B. glabrata* é a espécie mais importante como vetor do *S. mansoni*, pois sua distribuição geralmente está associada à ocorrência da esquistossomose, apresentando altos níveis de infecção. Já a susceptibilidade à infecção por meio de *B. straminea* é menor do que a de *B. glabrata*, porém, é a espécie que melhor se adapta às variações climáticas do país. No Nordeste, é a espécie responsável por manter a esquistossomose em grande parte do território. *B. tenagophila* possui uma distribuição geográfica mais restrita, sendo registrada em 10 estados brasileiros, além do Distrito Federal. Sua importância epidemiológica na transmissão do *S. mansoni* está concentrada nos estados das regiões Sul e Sudeste (BEZERRA; FERNANDEZ; THIENGO, 2016; NEVES, 2016; REY, 2015).

## 2.4 FISIOPATOLOGIA

A oviposição pelas fêmeas de *S. mansoni* faz com que parte desses ovos consigam atravessar a mucosa intestinal e alcance a luz do intestino, sendo eliminados nas fezes com a ajuda de enzimas e da resposta imune do hospedeiro. Outra parte dos ovos fica retida na mucosa intestinal, desencadeando uma reação inflamatória granulomatosa local. Aproximadamente um terço dos ovos é transportado pela corrente sanguínea até o fígado, onde ficam retidos em pequenos ramos venosos portais pré-sinusoidais, também desencadeando uma reação granulomatosa local. A junção do número de vermes que infectam o hospedeiro, a resposta imune desencadeada pela parasitose e os granulomas hepáticos ocasionados pelos ovos, resultam na formação de faixas de fibrose periportal, denominadas como Fibroses de Symmers, sendo uma lesão característica da esquistossomose (DOMINGUES, FERRAZ, 2012; ANDRADE, 2004).

A reação granulomatosa ao redor da instalação do ovo é considerada a principal causa das manifestações patológicas da esquistossomose, especialmente no fígado e no intestino. Após a morte do miracídio, as células inflamatórias do hospedeiro invadem e absorvem o ovo, em um processo que se estende por de 3 meses. O granuloma pode ser completamente absorvido ou ocasionar uma reação fibrótica residual, a depender da resposta imune.

A formação dos granulomas é uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos CD4 T-helper (Th0). Assim, o tipo de resposta imune desempenha um papel importante no desenvolvimento de formas graves da doença (ABATH et al., 2006). As células Th0 podem se diferenciar em Th1 ou Th2, regulando-se de maneira recíproca. Th1 produzem Interleucina (IL)2, INF-gama, e TNF, que ativarão mecanismos citotóxicos e inflamatórios e induzindo a sensibilidade celular retardada. A diferenciação de células Th0 em células Th2 resulta na dispersão de IL4, IL5, IL10 e IL13, que promovem a produção de anticorpos, principalmente IgE, e aumentam a proliferação e ativação dos eosinófilos. (ABATH et al., 2006).

Na fase crônica, há uma resposta modulada, a qual ocorre redução da resposta inflamatória aos novos ovos que continuam alcançando o fígado. A gravidade da infecção e a resposta imune do hospedeiro são fatores que determinam o desenvolvimento das formas clínicas da doença, dependendo do

tempo de infecção, da frequência de contato com os focos de transmissão e do número de infecções sucessivas. O tipo de resposta imune e o desenvolvimento de imunidade à infecção são influenciados pela carga genética do hospedeiro. Diferentes genes regulam a suscetibilidade à infecção, à reinfeção e à fibrogênese. Alguns indivíduos desenvolvem imunidade contra reinfeções, enquanto outros não (ABATH et al., 2006; DOMINGUES; FERRAZ, 2012).

O estágio inicial da esquistossomose é caracterizado por diferentes estágios. A forma assintomática da doença normalmente acomete moradores de áreas endêmicas e/ou com baixa carga parasitária. A forma sintomática é uma condição que manifesta-se quando acontece o primeiro contato com o parasito ou durante reinfeções após tratamento (LAMBERTUCCI, 2014).

Ainda na fase aguda sintomática, o primeiro sintoma, chamado de dermatite cercariana, ocorre entre as primeiras 72 horas da penetração das cercárias na pele. Apresenta-se como micropápulas eritematosas, que ocasionam prurido semelhante à picada de insetos. No estágio que antecede a postura dos ovos pela fêmea, a sintomatologia se desenvolve a partir de tosse seca, cefaléia, náuseas, febre, cólica abdominal, diarreia, leucocitose e eosinofilia, se relacionando diretamente com a resposta imune do hospedeiro e com a carga parasitária (JAURÉGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2010).

Na fase pós-postural, além do agravamento dos sintomas citados anteriormente, observa-se a presença de sangue nas fezes e sinais frequentes da doença, como hepatoesplenomegalia e a síndrome sistêmica de hipersensibilidade, além de infiltrados pulmonares em exames laboratoriais de imagem (DOMINGUES; FERRAZ, 2012; JAURÉGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2010).

A forma crônica da esquistossomose decorre de 3 a 4 meses após a infecção, sendo a forma assintomática uma condição clínica recorrente em áreas endêmicas, em indivíduos com baixa carga parasitária que cumprem papel na manutenção dos focos de transmissão, dando continuidade ao ciclo da doença. A forma sintomática, na fase crônica, pode se desenvolver a partir de diferentes manifestações clínicas, como: hepatointestinal, por meio de indisposição, tontura, perda de peso, anemia e diarreia sanguinolenta; e hepática, por meio de queixas intestinais, hepatomegalia, fibrose periportal moderada, varizes no esôfago, presença ou ausência de esplenomegalia (Figura 4) (DOMINGUES; FERRAZ, 2012).

**Figura 4:** Esquistossomose crônica ativa e tardia estabelecida



**Fonte:** McManus et al (2018).

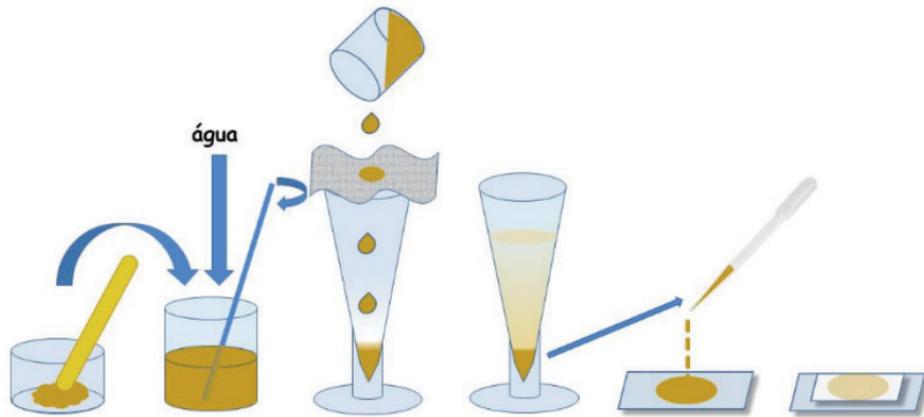
A neuroesquistossomose é uma das formas clínicas mais graves da doença, com acometimento do sistema nervoso central de maneira ectópica por meio da formação de granuloma, a partir da instalação do ovo de *Schistosoma sp.* na medula espinhal. Acomete segmentos torácicos baixos, lombar ou região sacral da medula espinhal e, também, a cauda equina. O início dos sintomas é dado por um quadro de dores na lombar e, posteriormente, por fraqueza muscular e alterações sensoriais (ANDRADE, 2008).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

### 2.5.1 Diagnóstico Parasitológico

A utilização de exames laboratoriais é indispensável para a confirmação da infecção pelo *S. mansoni*. O método de Hoffman, Pons e Janer, conhecido como sedimentação espontânea, utiliza um cálice cônico para filtrar 5 g de fezes através de gazes dobradas em quatro partes (Figura 5). Após o tempo de sedimentação, o sobrenadante é desprezado e o sedimento é analisado em microscópio para observação de ovos de helmintos e cistos de protozoários (HOFFMAN, PONS, JANER, 1934).

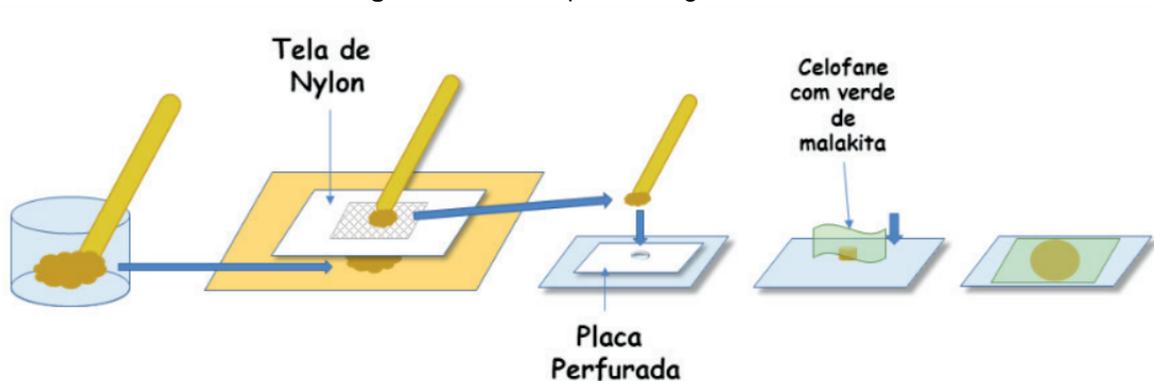
**Figura 5:** Técnica parasitológica de Hoffman, Pons e Janer.



Fonte: Pedrosa et al. (2019)

O diagnóstico parasitológico considerado padrão-ouro pela OMS para confirmação da esquistossomose é a técnica Kato-Katz (KK) (BARBOSA et al, 2017). A detecção ocorre por meio da filtragem das fezes por uma malha de 105  $\mu\text{m}$ , que, posteriormente, é transferida para a lâmina através de um molde plástico para padronização da técnica (Figura 6). A cobertura da lâmina é realizada por uma lamínula de papel celofane embebida em corante de verde malaquita e, após secagem, a análise microscópica é realizada para a contagem dos ovos e multiplicação por fator 24 para obtenção das quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) (KATZ, CHAVES, PELLEGRINO, 1972; UTZINGER, 2015). A técnica é capaz de identificar ovos de outros helmintos que são eliminados por fezes, como também, estabelecer a carga parasitária de *S. mansoni* como leve (até 99 OPG), moderada (100 a 399 OPG) e elevada (igual ou acima de 400 OPG) (WHO, 2020).

**Figura 6:** Técnica parasitológica de Kato-Katz.



Fonte: Pedrosa et al. (2019)

Apesar de apresentarem baixo custo e alta especificidade, em áreas de baixa

endemicidade apresenta baixa sensibilidade. Como resultado, há um aumento de resultados falsos negativos para pacientes com carga parasitária leve, resultando na subnotificação dos casos e a manutenção de indivíduos infectados como reservatório da doença, além de dificultar a avaliação das medidas de controle para a doença (ENK, 2008; BRASIL, 2014)

As estratégias adotadas para contornar essa situação são a realização de esfregaços em replicata e/ou a coleta de mais de um material fecal em diferentes dias (OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, o aumento do processamento de material aumenta o custo e o tempo de análise, sendo necessária a implementação de novas alternativas diagnósticas mais sensíveis, como ensaios imunológicos e moleculares (SILVA-MORAES et al., 2019).

### 2.5.2 Diagnóstico Imunológico

A detecção da infecção por meio de ensaios imunológicos ocorre pela identificação de anticorpos ou antígenos circulantes, sendo classificados como diretos e indiretos. O método direto identifica antígenos específicos do parasito, enquanto o indireto detecta anticorpos produzidos pelo hospedeiro contra o patógeno (DE JONGE et al, 1991).

As reações para diagnóstico imunológico são complementares aos exames parasitológicos, estando comercialmente disponíveis em *kits* de ELISA e *kits* de hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti-*S. mansoni* (COSTA, 2018). No entanto, o método mais descrito é o POC-CCA, um teste rápido de imunocromatografia que detecta o antígeno catódico circulante (CCA), presente na urina ou soro dos pacientes (Figura 7) (ETTEN et al., 1994). O CCA é um polissacarídeo carregado positivamente e com peso molecular baixo, sendo secretado pelo verme adulto. Todavia, apesar de ser melhor detectado na urina, a concentração do antígeno diminui consideravelmente após o tratamento com quimioterápicos e a acurácia do teste está relacionada diretamente com o grau de infecção e com a prevalência (DEELDER et al, 1976; CAVALCANTI, CUNHA, PERALTA, 2019; SIQUEIRA et al., 2016).

**Figura 7:** Teste rápido Schisto POC-CCA™ para diagnóstico imunológico de esquistossomose.



**Fonte:** ICT *diagnostics*. Disponível em: <http://www.ictdiagnostics.co.za/schistosoma1.html>.

### 2.5.3 Diagnóstico Molecular

As técnicas moleculares utilizadas para investigação de patógenos baseiam-se na detecção de DNA do parasito em amostras biológicas de indivíduos suspeitos de infecção. Para isso, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta importante para detecção do material genético em amostras com carga parasitária leve, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (PONTES; DIAS-NETO; RABELLO A., 2002).

Para a realização de um ensaio de PCR, regiões alvo de DNA de fita simples ou de fita dupla são amplificadas exponencialmente por meio da utilização de uma enzima polimerase, em diferentes ciclagens com variações de temperatura. A reação ocorre essencialmente a partir da adição de (1) duas pequenas sequências de iniciadores, os *primers*, que são complementares à região alvo do DNA de estudo; (2) quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dGTP, dCTP, dATP e dTTP) que serão adicionados a sequência; (3) enzima polimerase termoestável e solução tampão (EISENSTEIN, 1990).

As etapas envolvidas na técnica se iniciam pela desnaturação da dupla fita de DNA com elevadas temperaturas (entre 92 e 95°C), com a finalidade de quebra das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. A desnaturação deixa em evidência a sequência alvo que será utilizada na etapa de anelamento com o iniciador previamente sintetizado, ocorrendo em temperaturas entre 35 e 60°C. Nesta etapa, é de suma importância que as sequências de *primers* não anelem entre si, além da garantia da pureza da amostra de DNA com técnicas eficientes de extração, para que se evite o surgimento de ampliações indesejadas, chamadas de ampliações inespecíficas (EISENSTEIN, 1990).

Por fim, a enzima polimerase realiza a fase de extensão em torno de 72°C,

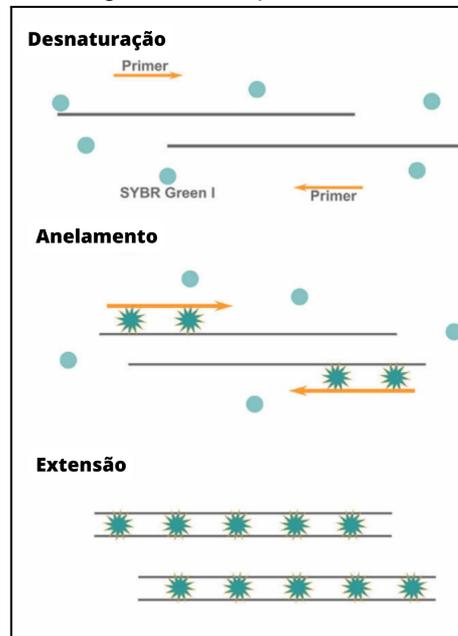
seguindo o sentido 5'→3', incorporando as moléculas de desoxirribonucleotídeos trifosfatados de maneira complementar na sequência. O consumo dos reagentes ocorre à medida que os ciclos destas três etapas são repetidos, aumentando de maneira exponencial a quantidade da sequência alvo e a visualização do produto pode ser realizada de maneira qualitativa por meio da eletroforese em gel de agarose em sistemas de PCR convencional (EISENSTEIN, 1990; TAYLOR, 1993).

A partir do uso da PCR convencional, surgiram variações da ferramenta como novas alternativas, por exemplo: a PCR *Multiplex*, com a amplificação de mais de um alvo em uma única reação (HAWKINS; GUEST, 2016); *Nested-PCR*, duas reações de dupla amplificação, em que o produto da primeira é aplicado na segunda, aumentando a sensibilidade (MELO, 2006); LAMP-PCR, que ocorre em temperatura constante e a visualização do produto pode ser realizada com adição de corante ao próprio tubo de reação (GOMES; JÚNIOR; MELO, 2022); e a PCR em tempo real, empregada para quantificação da amplificação do material genético, sem utilização de eletroforese e evitando contaminações exógenas na reação (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014).

Como uma alternativa quantitativa à PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR) utiliza fluoróforos que se hibridizam à dupla fita de DNA ao passo que ocorrem as amplificações. Esse processo pode ocorrer a partir de duas abordagens metodológicas: utilização de corantes ligantes de dupla fita de DNA ou pelo emprego de oligonucleotídeos marcados com fluoróforos, como em sistemas Taqman<sup>®</sup> de sondas de hidrólise (TAJADINI, PANJEHPOUR, JAVANMARD, 2014; KRALIK; RICCHI, 2017).

Na utilização de intercalantes, é empregado um corante - normalmente, SYBR<sup>®</sup> Green I, o qual apresenta ligação com a dupla-fita de DNA sintetizada ao longo dos ciclos da qPCR (FLEIGE; PFAFFL, 2006). Ao longo da reação, os produtos são sintetizados (*amplicons*), havendo a ligação do corante a cada síntese de dupla-fita e, com isso, mais SYBR<sup>®</sup> Green I será ligado à sequência, resultando em um aumento proporcional da fluorescência (Figura 8) (BOTES, KWAADSTENIET, CLOETE, 2013). Entretanto, sua desvantagem se deve ao fato dos corantes presentes na reação serem inespecíficos, podendo se ligarem a subprodutos como dímeros de *primers* (ARIKAWA et al., 2008).

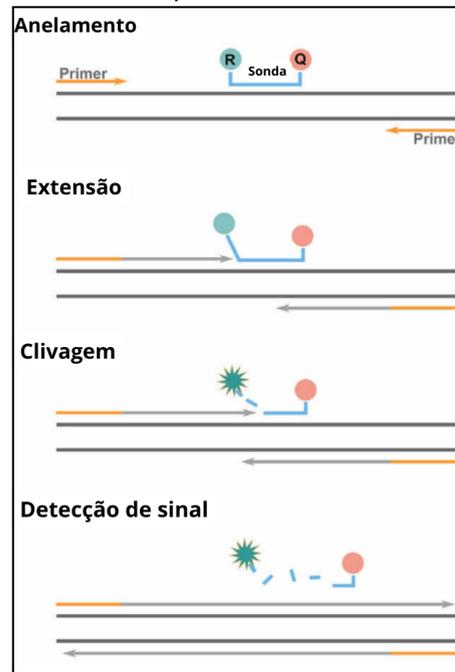
**Figura 8:** Esquema representativo da técnica de PCR em tempo real baseada na utilização de corantes ligantes de dupla fita de DNA.



**Fonte:** Adaptado de Integra (2022). Disponível em: <https://www.integra-biosciences.com/china/en/blog/article/how-does-qpcr-work-sybr-green-vs-taqman>

No sistema empregando oligonucleotídeos complementares à sequência alvo, são acopladas as seguintes moléculas: o *reporter*, que estará ligado na extremidade 3' da sonda de DNA e tem a função de emitir energia por meio de fluorescência quando a exonuclease da reação clivar a sequência, separando-o do *quencher*, que por sua vez, estará localizado na extremidade 5' e realiza o bloqueio da fluorescência. Assim, o sinal de fundo não específico é suprimido, aumentando a especificidade e a sensibilidade da detecção durante a qPCR (NAVARRO et al., 2015) (Figura 9).

**Figura 9:** Esquema representativo da técnica de PCR em tempo real baseada em oligonucleotídeos marcados com fluoróforo. “R” representa o “*reporter*”, ligado na extremidade 3’ da sonda e “Q” representando o “*quencher*”, na extremidade 5’.

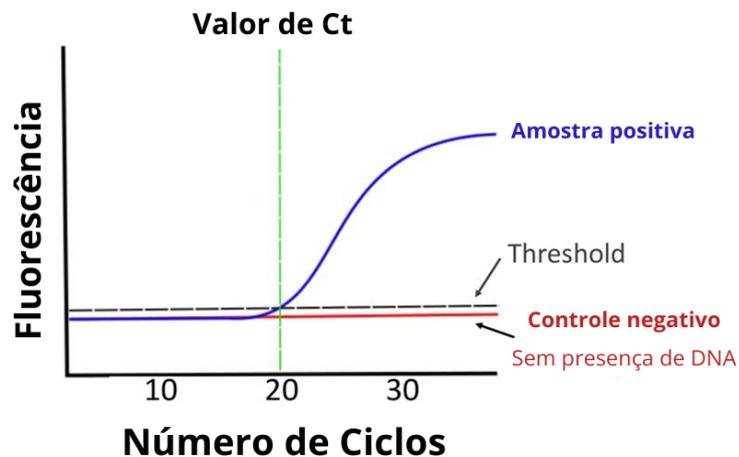


**Fonte:** Adaptado de Integra (2022). Disponível em:

<https://www.integra-biosciences.com/china/en/blog/article/how-does-qpcr-work-sybr-green-vs-taqman>

Durante a reação, o *software* gera um gráfico em tempo real (Figura 10), onde são relacionados os ciclos, no eixo das abscissas, e a fluorescência emitida, no eixo das ordenadas. Cada linha projetada sobre o gráfico representa uma amostra, que se eleva ao passo que a detecção da fluorescência aumenta de maneira exponencial. O ultrapassamento da amostra sobre a linha paralela ao eixo X presente no gráfico, faz com que seja computado o limiar de detecção, conhecido como “*threshold*” e a quantidade de ciclos necessários para o cruzamento da linha é chamado de “*cycle threshold*” (Ct). Assim, o número de Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade de gene alvo na reação, ou seja, quanto menor o seu valor, maior a presença do gene de interesse (Thermo Fisher Scientific, 2016).

**Figura 10:** Representação do gráfico de amplificação de PCR em tempo real.



**Fonte:** Adaptado de bioMérieux *industry*. Disponível em: <https://www.biomerieux-industry.com/pt/food-safety-quality/resources/scientific-library/2020-11-25-part-6-pcr-detection-beer-spoilage>.

Portanto, a aplicação de ferramentas moleculares para a detecção de *S. mansoni* pode ser uma alternativa para a diminuição dos casos de subnotificação em áreas de baixa endemicidade, uma vez que são capazes de identificar a presença do patógeno em pequenas quantidades de amostra. Em adição, o estabelecimento da PCR em tempo real como método diagnóstico pode auxiliar na composição de um diagnóstico combinado, o qual é recomendado pela Organização Mundial de Saúde para controle e eliminação da esquistossomose humana (WHO, 2022).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade da Sm1-7qPCR para detecção de DNA de *S. mansoni* em modelo murino com infecção controlada.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar diferentes métodos de extração de DNA de *S. mansoni* em amostras de fezes;

- II. Otimizar a técnica Sm1-7qPCR com quantidades conhecidas de DNA genômico de *S. mansoni*;
- III. Aplicar o sistema de Sm1-7qPCR otimizado em DNA extraído das amostras de fezes de camundongos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DE ESTUDO

O estudo foi feito controladamente, utilizando 15 camundongos fêmeas de linhagem Swiss webster que foram expostos à infecção com 100 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE), empregados na manutenção do ciclo biológico do parasito no Laboratório de Referência em Esquistossomose (LRE), Fiocruz, Pernambuco. O recolhimento de suas fezes foi realizado após 42 dias da data de infecção, para obtenção dos ovos de *S. mansoni*.

Para isso, os animais foram submetidos a ambiente controlado de 24 a 26°C, durante 50 minutos, e separados isoladamente em caixas microisoladoras de 31,6 cm x 21,5 cm x 20,7 cm, sem disposição de comida e água, e com ausência de maravalha, para evitar contato de resíduos e urina. As fezes foram recolhidas com auxílio de uma pinça e refrigeradas à - 20 °C para processamento posterior.

A coleta também foi realizada para 15 camundongos não infectados, estabelecidos como controle negativo. No total, as 30 amostras recolhidas (de infectados e não infectados) foram submetidas às técnicas parasitológicas de Kato-Katz (KATZ, CHAVES, PELLEGRINO, 1972) e Hoffman (HOFFMAN, PONS, JANER, 1934), para confirmação da infecção.

### 4.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

As amostras de fezes obtidas foram utilizadas para comparação de dois métodos de extração de DNA: (1) *kit QIAamp Power Fecal®* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante; (2) método *in house* baseado na técnica de fenol-clorofórmio adaptado (SAMBROOK et al., 1989).

Para o método adaptado *in house*, foi adicionado 1000µl de tampão de lise (50mM Tris, 100mM EDTA, 1% SDS, pH 8,0) e 1 mg/ml de proteinases K, cujos componentes foram homogeneizados gentilmente e incubados em estufa a 56°C por 12 horas (Fanem, São Paulo, Brazil). Em seguida, o material foi “vortexado” e centrifugado 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 o precipitado formado (DNA) permaneceu em temperatura ambiente até a completa evaporação do álcool isopropílico. Por fim, adicionou-se 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 DNases, enzimas capazes de degradar o DNA.

Posteriormente, a concentração de DNA nas amostras foi estabelecida no espectrofotômetro de microvolumes NanoDrop One ® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a partir das análises do coeficiente de pureza A260/280.

Cinco vermes adultos machos de *S. mansoni* de cepa LE também foram utilizados para a extração de DNA por meio de *kit* comercial QIAamp Power Fecal® (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo a recomendação do fabricante, para a realização da otimização do sistema.

#### 4.3 MÉTODOS MOLECULARES

##### 4.3.1 Nested-PCR

Para fins de comparação, a Nested-PCR foi aplicada no DNA das amostras de fezes que foram extraídas pelo método *in house* e por *kit* comercial, reproduzindo

o protocolo adaptado de Melo et al. (2006). Para isso, realizou-se, inicialmente, uma PCR convencional, preparada a partir de uma solução de 25 µl contendo tampão Tris-HCl (1x), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de mix de dNTP, 0,1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA), 2 pmol dos *primers* externos *Schfo11* (5'-GTT ACG ATC AGG ACC AGT GT-3') e *Unvre16* (5'-CCG GAC ATC TAA GGG CAT CA-3') e 2 µL de DNA das amostras coletadas (aproximadamente 30 ng/µL). As amplificações foram obtidas a partir do termociclador *LifePro thermal cycler* (Bioer Technology, Zhejiang, China), programado com fases de desnaturação inicialmente a 92°C por 3 min, seguida por a 92°C por 30s, anelamento de 63°C por 1min e por fim, com extensão de 72°C por 1 min, repetidas em 30 ciclos. Foram incluídas amostras positivas com 1 ng/µL de DNA de *S. mansoni* e um controle negativo para observação de contaminação.

A seguir, a etapa de *Nested* foi realizada utilizando os mesmos parâmetros da PCR convencional, alterando a concentração dos *primers* (5 pmol) externos pelos internos *Schfo17* (5'-GTG CTG GTG GGT TGA CGA GTT C-3') e *Schre19* (5'-CTA AAC GAG CAC AGA GGA C-3'), além da temperatura de anelamento a 53°C. Adicionou-se 2 µL do produto da primeira PCR para a reação.

Os amplicons da Nested-PCR foram aplicados em de 2% de agarose e marcados em brometo de etídio. Foi utilizado o ladder para comparação da altura de bandas das amostras (721 pb) a partir da marcação de 100pb. A bandas de DNA foram separadas por 60 minutos, a 90V em 1,0x tampão TAE, visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta, sendo fotografadas com um sistema de documentação LPix EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

#### 4.3.2 Técnica Reação De Polimerase em Cadeia Em Tempo Real (Sm1-7qPCR)

A amplificação de DNA em tempo real foi realizada a partir de um conjunto de *primers* e sondas específicos para a região Sm1-7 em tandem do rDNA (121 pb), descrita por Hamburger et al. (1991). As sequências dos *primers* utilizadas foram para *forward* F2: 5'-CCG ACC AAC CGT TCT ATG A-3'; e *reverse* R2: 5'-CAC GCT CTC GCA AAT AAT CTA AA- 3' [25]; já a sonda foi PO2: 5'- 6 [FAM] TCG TTG TAT CTC CGA AAC CAC TGG ACG [(BHQ1)] - 3', sintetizados pela *Sigma Life Sciences* (Woodlands, Texas, EUA). Assim, todas as amostras foram avaliadas em duplicatas utilizando reagentes TaqMan® (Life Technologies, California, USA).

A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Espírito-Santo et al., 2014, em volume final de 20  $\mu\text{L}$ , constituído por 10  $\mu\text{L}$  de TaqMan® Universal Master Mix PCR 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 0,8 pmol dos primers F2 e R2 e 0,8 pmol da sonda PO2 [FAM] (Sigma Custom Products) e 2  $\mu\text{L}$  de DNA purificado (aproximadamente 30 ng/ $\mu\text{L}$ ). Para cada amostra, outra reação foi realizada em paralelo, utilizando o controle exógeno positivo (IPC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) em volume final de 21  $\mu\text{L}$ , constituída por 10  $\mu\text{L}$  de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X, 5  $\mu\text{L}$  do controle exógeno IPC 10X, 1  $\mu\text{L}$  do controle exógeno IPC 50X e 2  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA purificado (aproximadamente 30 ng/ $\mu\text{L}$ ). Os ensaios foram realizados no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio 5® (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), aplicando as seguintes condições: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 minuto.

Para determinar a sensibilidade analítica, foram realizadas diluições de fator 10, seriadas, em que foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de DNA de *S. mansoni* nas seguintes concentrações: 1 ng/ $\mu\text{L}$ ; 100 pg/ $\mu\text{L}$ ; 10 pg/ $\mu\text{L}$ ; 1 pg/ $\mu\text{L}$ ; 100 fg/ $\mu\text{L}$ ; 10 fg/ $\mu\text{L}$  e 1 fg/ $\mu\text{L}$ .

#### 4.4 ANÁLISE DE RESULTADO

Foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos da Sm1-7qPCR, com intervalos de confiança de 95% (Quadro 1).

**Quadro 1:** Modelo esquemático para cálculo dos parâmetros utilizados para validação do sistema qPCR.

TESTE	INFECTADO <sup>1</sup>	NÃO INFECTADO <sup>1</sup>	TOTAL
POSITIVO <sup>2</sup>	a	b	a + b
NEGATIVO <sup>2</sup>	c	d	c + d
TOTAL	a + c	b + d	a + b + c + d = n

<sup>1</sup> Expostos à infecção por cercária.

<sup>2</sup> Testes diagnósticos.

- Sensibilidade =  $a / a + c$ : Refere-se à percentagem de resultados positivos obtidos pelo teste aplicado, frente ao número real de infectados, realizado a partir da exposição às cercárias, ou seja, a proporção de resultados verdadeiramente positivos.

- Especificidade =  $d / b + d$ : Refere-se à percentagem de resultados negativos obtidos pelo teste aplicado, frente ao número real de não-infectados, ou seja, a proporção de verdadeiros negativos.
- Valor preditivo positivo (VPP) =  $a / a + b$ : Refere-se à probabilidade de animais infectados em relação ao número total de resultados positivos dos exames.
- Valor preditivo negativo (VPN) =  $d / c + d$ : Refere-se à probabilidade de animais não infectados em relação ao número total de resultados negativos dos exames.

A avaliação de concordância de todos os testes utilizados nesta pesquisa foi realizada por meio do índice *Kappa* ( $K$ ). O índice  $K$  é um dos melhores indicadores de concordância em relação à taxa geral de concordância, por ser um indicador de concordância ajustada, pois considera a concordância devida à chance. O  $K$  informa a proporção de concordância não aleatória (além da esperada pela chance) entre observadores ou medidas da mesma variável categórica, e seu valor varia de "menos 1" (completo desacordo) a "mais 1" (concordância total). Se a medida concorda mais frequentemente do que seria esperado pela chance, então o índice  $K$  é positivo; se a concordância é completa  $K = 1$ . Zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso. O quadro 2 apresenta os valores do  $K$  e respectivas interpretações.

**Quadro 2:** Escala de concordância do *Kappa* ( $K$ )

<b>Kappa</b>	<b>Concordância</b>
< 0,00	Nenhuma
0,01 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Adaptado de Richard & Koch (1977).

O índice *Kappa*, assim como os demais testes estatísticos que foram utilizados para análise dos dados desta pesquisa foram realizados no *software* Stata (versão 14).

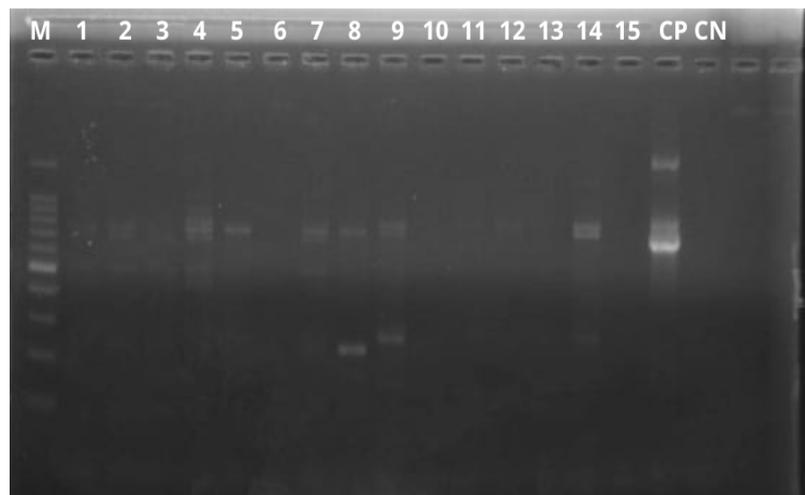
#### 4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto utilizou amostras de fezes dos camundongos empregados na manutenção do ciclo do *S. mansoni* no LRE/Fiocruz/PE. Para tanto, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz (CEUA: nº 173/2021).

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

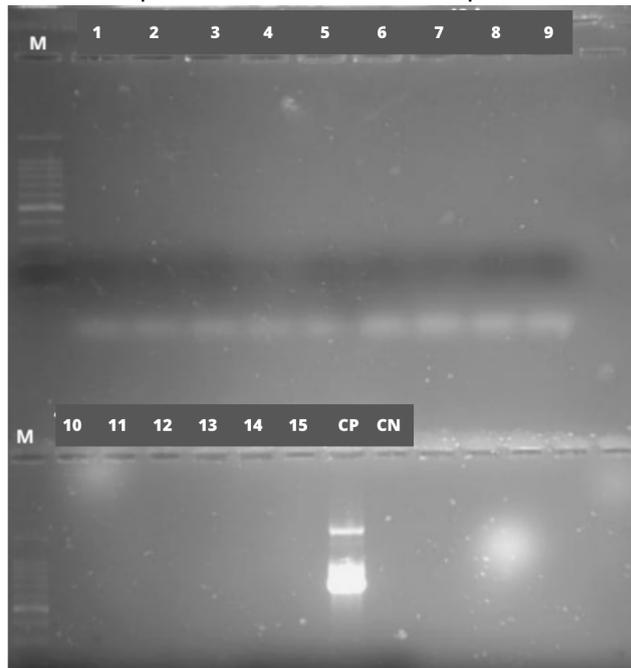
A aplicação da técnica de Fenol:Clorofórmio nas amostras de camundongos resultou na presença de ampliações inespecíficas, quando aplicada a *Nested-PCR* nas amostras de camundongos não infectados (Figura 11). Enquanto nas amostras de camundongos infectados, não houve a indicação da presença de material genético de *S. mansoni* (Figura 12).

**Figura 11:** Gel de agarose (2%) com o resultado de *Nested-PCR* do DNA das amostras de fezes de camundongos não infectados por *S. mansoni* e extraídas por fenol:clorofórmio.



Legenda: (M) Marcador de 100pb. (CP) Controle positivo. (CN) Controle negativo.

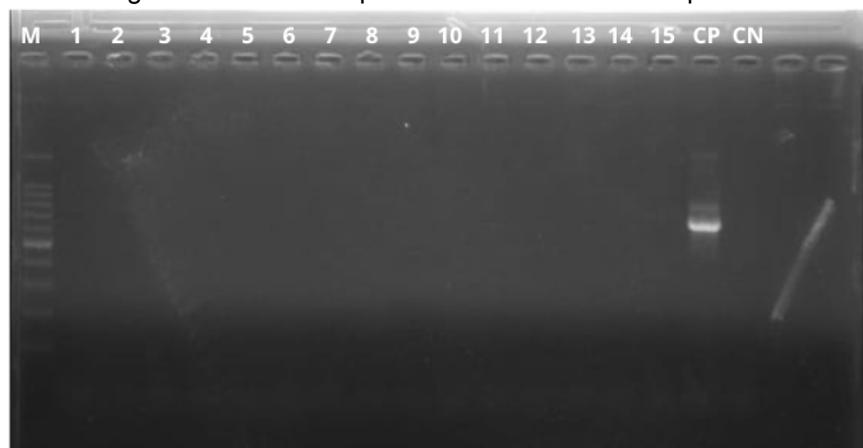
**Figura 12:** Gel de agarose (2%) com o resultado de *Nested-PCR* do DNA das amostras de fezes de camundongos infectados por *S. mansoni* e extraídas por fenol:clorofórmio.



Legenda: (M) Marcador de 100pb. (CP) Controle positivo. (CN) Controle negativo.

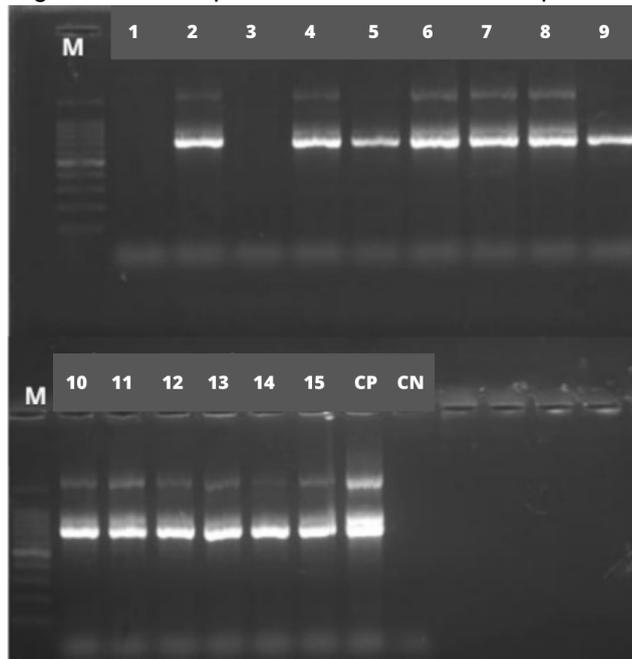
Quando considerada as instruções estabelecidas pelo fabricante, o *kit* comercial mostrou-se mais eficiente no processo de extração de DNA. Após a técnica *Nested-PCR*, não houveram ampliações inespecíficas para o grupo sem infecção (Figura 13). Enquanto que no grupo infectado, houve a detecção de *S. mansoni* em 86,6% (13/15) das amostras de camundongos (Figura 14).

**Figura 13:** Gel de agarose (2%) com o resultado de *Nested-PCR* do DNA das amostras de fezes de camundongos não infectados por *S. mansoni* e extraídas por *kit* comercial.



Legenda: (M) Marcador de 100pb. (CP) Controle positivo. (CN) Controle negativo.

**Figura 14:** Gel de agarose (2%) do resultado de *Nested-PCR* do DNA das amostras de fezes de camundongos infectados por *S. mansoni* e extraídas por *kit* comercial.



Legenda: (M) Marcador de 100pb. (CP) Controle positivo. (CN) Controle negativo.

Para a verificação do desempenho desejável dos ensaios moleculares, faz-se necessária a avaliação dos parâmetros de absorvância A260/280 emitidos pelo espectrofotômetro de microvolumes NanoDrop One® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) no DNA extraído das amostras (Tabela 1).

**Tabela 1:** Concentração e pureza do DNA a partir da extração *in house* e por *kit* comercial

Camundongos infectados	Fenol		Kit comercial	
	Concentração (ng/uL)	A260/280	Concentração (ng/uL)	A260/280
1	90,6	1,49	261,8	1,9
2	61,5	1,48	408	1,9
3	183,6	1,44	260,9	1,88
4	24,2	1,49	298,5	1,89
5	95,6	1,42	204,8	1,89
6	191	1,57	286,4	1,89
7	655,4	1,91	311,3	1,88
8	321,6	1,52	166,8	1,87
9	365,3	1,68	161,9	1,87
10	124,9	1,52	181,3	1,87
11	790	1,56	320,1	1,9
12	217,8	1,37	356,6	1,89

13	764,8	1,6	351,5	1,89
14	286,4	1,38	470,4	1,9
15	1695	1,75	406,6	1,9
Camundongos não infectados	Concentração (ng/uL)	A260/280	Concentração (ng/uL)	A260/280
1	539,8	1,52	368,0	1,94
2	708,4	1,73	365,0	1,94
3	466,1	1,6	266,0	2,03
4	245,8	1,97	186,0	1,95
5	217,7	1,43	135,0	1,89
6	418,2	1,56	271,0	1,94
7	512,9	1,56	462,0	1,98
8	567,3	1,53	350,0	1,9
9	895,8	1,43	158,0	2,02
10	426,2	1,56	268,0	1,9
11	66,6	1,76	510,0	2,02
12	264,2	1,38	162,0	1,97
13	171,8	1,58	300,0	2,07
14	175,2	1,82	109,0	1,91
15	1108,7	1,57	440,0	2,04

Para que seja verificada a condição que proporcione o melhor desempenho das técnicas moleculares, faz-se necessária a etapa inicial de extração do material genômico por meio de diferentes métodos. Em amostras de fezes, por exemplo, existem contaminantes que provêm do sistema digestivo - como microrganismos, bilirrubina, fibras, proteínas etc, os quais podem inibir as reações se não removidos corretamente durante a etapa de extração do material genômico (KOZLOSKI, 2017).

A técnica de Fenol:Clorofórmio é considerada uma técnica *in house*, ou seja, seus reagentes são manipulados baseados em proporções e sua qualidade depende no manuseio do indivíduo responsável e, devido a isso, as amostras não ficam livres totalmente de contaminantes. Em contrapartida, é um método de baixo custo e acessível para laboratórios de pequeno porte (PEREIRA et al., 2019). Entretanto, os kits comerciais possuem fases de extração em que são adicionados reagentes e tampões, os quais interagem com o DNA presente nas fezes de maneira muito específica e em condições pré-estabelecidas pelo fabricante. Apesar de terem um

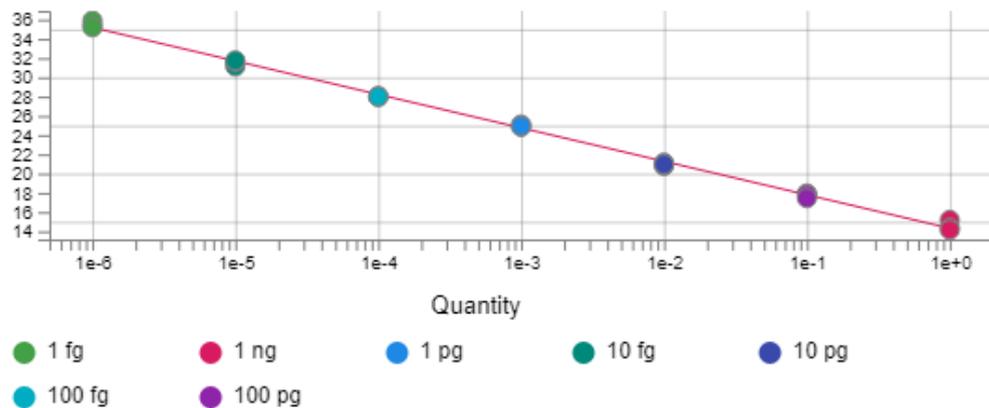
custo por extração mais elevado, evitam contaminações e a necessidade de repetição do protocolo de extração.

Alterações na relação de pureza A260/280 indicam contaminação por outros componentes orgânicos, como proteínas, RNA, compostos aromáticos, entre outros, e podem interferir nas técnicas de biologia molecular por meio de ampliações inespecíficas ou inibindo a reação. As proteínas presentes nas amostras absorvem a luz no comprimento de onda de 280 nm, sendo assim, o coeficiente de absorbância entre 1,8 e 2,0 seria considerado adequado para DNA (PEREIRA et al., 2019).

Os dados presentes na tabela 1 destacam a variação de absorbância entre 1,87 e 1,9 para as amostras extraídas pelo *kit* QIAamp Power Fecal® e com baixa variação entre as concentrações das amostras. Por outro lado, nas amostras extraídas pelo método de fenol:clorofórmio, a absorbância evidenciou baixo grau de pureza com A260/280, entre 1,37 e 1,91, e concentrações variáveis para amostras submetidas às mesmas condições. Assim, a partir destes resultados, as amostras extraídas por *kit* comercial foram classificadas como mais eficientes para serem utilizadas nos ensaios moleculares, sendo adicionadas a reação de qPCR.

Em relação à Sm1-7qPCR, a sensibilidade analítica para o sistema TaqMan® realizada a partir da curva padrão de DNA genômico dos vermes de *S. mansoni*, em triplicata, apresentou bom desempenho ao reproduzir as condições originais de ciclagem, concentrações dos *primers* e sonda apresentadas por Espírito-Santo *et al.* (2014). Com isso, a análise obtida por meio da plataforma *Thermo Fisher Connect™*, evidenciou: *Threshold* = 0,221; parâmetro de desvio entre replicatas (*Slope*) = -3,479, sendo adequado entre -3,1 e -3,6;  $R^2 = 0,998$ , valor de  $R^2 > 0,99$  proporciona boa confiança na correlação de dois ou mais valores de Ct; e Eficiência = 93,84%, sendo considerada aceitável entre 90 e 110% (Thermo Fisher Scientific, 2016) (Figura 15).

**Figura 15:** Sensibilidade analítica do sistema Sm1-7qPCR.



Legenda: Círculos representam a quantidade de massa por microlitro de cada ponto. O eixo das ordenadas representa os valores de Ct. O eixo das abscissas representa a concentração de DNA de *S. mansoni* para cada amostra.

O Ct médio das triplicatas foram: 14,58 para 1 ng/ $\mu$ L; 17,72 para 100 pg/ $\mu$ L; 20,97 para 10 pg/ $\mu$ L; 24,97 para 1 pg/ $\mu$ L; 28,01 para 100 fg/ $\mu$ L; 31,50 para 10 fg/ $\mu$ L; e 35,52 para 1 fg/ $\mu$ L, sendo este o ponto de corte para classificação das amostras. Assim, nossos dados corroboram com a aplicação do sistema de PCR em tempo real para modelo murino estabelecido por Espírito-Santo et al. (2014), cujos autores destacaram um Ct de corte de 35,83. Desse modo, as amostras com Ct inferior ou igual a 35,52 foram consideradas positivas para esquistossomose, enquanto amostras com valor de Ct superior a 35,52 ou com Ct indeterminado foram consideradas negativas.

O diagnóstico da esquistossomose é realizado a partir da descoberta de ovos do parasito nas fezes por meio dos métodos parasitológicos de Hoffman e de Kato-Katz (KK), este considerado “padrão-ouro” para a doença. Diante da aplicação das técnicas nas 15 amostras infectadas, a sedimentação espontânea identificou a presença de ovos em 66,6% (10/15) das amostras de fezes dos camundongos infectados (Tabela 2). A técnica de KK identificou carga parasitária em 73,3% (11/15) da amostragem. No entanto, a aplicação dos ensaios moleculares de *Nested*-PCR e Sm1-7qPCR apresentaram resultados semelhantes na detecção de material genômico de *S. mansoni*, com positividade de 86,7% (13/15). As 15 amostras obtidas do grupo de não infectados apresentaram resultados negativos para *S. mansoni* em todos os testes (Tabela 2).

**Tabela 2:** Apresentação do resultado dos testes parasitológicos e moleculares dos camundongos infectados e não infectados

Grupo	Amostra	KK				Ct médio
		(OPG)	Hoffman	Nested-PCR	qPCR	
Infectados	1	0	-	-	-	36,2835
	2	24	-	+	+	22,3025
	3	0	-	-	-	indeterminado
	4	0	-	+	+	22,835
	5	0	-	+	+	26,879
	6	384	+	+	+	21,509
	7	72	+	+	+	21,9625
	8	312	+	+	+	22,5275
	9	24	+	+	+	27,6885
	10	144	+	+	+	22,686
	11	960	+	+	+	20,3105
	12	264	+	+	+	20,6725
	13	360	+	+	+	18,838
	14	336	+	+	+	20,188
	15	1152	+	+	+	18,506
Não infectados	1	0	-	-	-	indeterminado
	2	0	-	-	-	indeterminado
	3	0	-	-	-	indeterminado
	4	0	-	-	-	indeterminado
	5	0	-	-	-	indeterminado
	6	0	-	-	-	indeterminado
	7	0	-	-	-	indeterminado
	8	0	-	-	-	indeterminado
	9	0	-	-	-	36,059
	10	0	-	-	-	indeterminado
	11	0	-	-	-	indeterminado
	12	0	-	-	-	indeterminado
	13	0	-	-	-	indeterminado
	14	0	-	-	-	indeterminado
	15	0	-	-	-	indeterminado

(KK) Técnica parasitológica de Kato-Katz; (OPG) Ovos por grama de fezes; (+) Positivo para *S. mansoni*; (-) Negativo para *S. mansoni*; (Ct) *cycle threshold*.

O uso de apenas métodos parasitológicos para investigação de helmintoses faz com que o número de subnotificações aumentem e corrobora com a manutenção

do ciclo das doenças. Trabalhos como o documentado por Berhe et al. (2004) reforçam a baixa prevalência para a técnica de Kato-Katz feita em uma única lâmina (31,3%), obtendo aumento quando realizada com esfregaços triplos (45,7%) e quintetos (52,1%). As ferramentas moleculares, quando aplicadas ao diagnóstico, apresentam boa sensibilidade para detecção de *Schistosoma spp.*. Fuss, Mazigo e Mueller (2020) destacaram 34,3% de prevalência e 44,4% de sensibilidade para o teste de Kato-Katz, porém, a positividade das amostras aumentou para 77,1%, quando realizado o diagnóstico combinado com qPCR.

Situações em que o uso de reações moleculares apresentaram melhor desempenho em relação aos métodos coproscópicos não são incomuns. A sensibilidade analítica da técnica de PCR identifica a presença de DNA de parasitos, mesmo sem a presença de ovos em replicatas de lâminas. Estes casos ocorrem, principalmente, quando indivíduos estão localizados em áreas de baixa endemicidade, possuem quadro de imunossupressão e/ou apresentam baixa carga parasitária (GROBUSCH et al, 2003; CLERINX, GOMPEL, 2011; CNOPS et al., 2012).

A aplicação do sistema TaqMan® de Sm1-7qPCR detectou a presença de material genético de *S. mansoni* em 86,7% dos camundongos infectados. O valor médio de Ct para as amostras foi de 21,546, com desvio padrão de 4,6 (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados positivos obtidos por meio do ensaio de Sm1-7qPCR, juntamente com os valor de Ct obtidos na amostragem de camundongos infectados

Método	Positivos/ Total	%	Valor de Ct (Log) qPCR				
			Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
qPCR	13/15	86,7	21,546	4,6	22,132	18,506	36,283

É recomendada a validação de sistemas de qPCR em termos analíticos, pois demanda pouco tempo de reação, diminui gastos com técnicas para visualização dos *amplicons* e, ao contrário dos ensaios convencionais, não é necessário o manuseamento pós-PCR, evitando contaminações (MACKAY, 2004).

Os parâmetros epidemiológicos analisados obtiveram diferentes resultados ao se comparar os testes diagnósticos realizados com a exposição controlada às cercárias. A sensibilidade encontrada foi de 73,3% (CI 95%: 44,9 - 92,2%) para Kato-Katz; 66,7% (CI 95%: 38,4 - 88,2%) para Hoffman; e os mesmos valores para

*Nested*-PCR e qPCR, 86,7% (CI 95%: 59,5 - 98,3%), sendo as ferramentas moleculares as que apresentaram maior sensibilidade. Além disso, a análise de sensibilidade entre testes de mesma natureza foi de 100% (CI 95%: 75,3 -100%) para os ensaios moleculares e 90,9% (CI95%: 58,7 - 99,8%) para os exames parasitológicos (Tabela 4).

**Tabela 4:** Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN apresentadas pelos ensaios com infecção controlada de camundongos com cercárias de *S. mansoni*

Método	Parâmetro	Estimativa (%)	CI 95%	
			CI 95% mínimo	CI 95% máximo
Infecção controlada x KK	Sensibilidade	73,3	44,9	92,2
	Especificidade	100	78,2	100
	VPP	100	71,5	100
	VPN	78,9	54,4	93,9
Infecção controlada x Hoffman	Sensibilidade	66,7	38,4	88,2
	Especificidade	100	78,2	100
	VPP	100	69,2	100
	VPN	75	50,9	91,3
Infecção controlada x <i>Nested</i> -PCR	Sensibilidade	86,7	59,5	98,3
	Especificidade	100	78,2	100
	VPP	100	75,3	100
	VPN	88,2	63,6	98,5
Infecção controlada x Sm1-7qPCR	Sensibilidade	86,7	59,5	98,3
	Especificidade	100	78,2	100
	VPP	100	75,3	100
	VPN	88,2	63,6	98,5
Sm1-7qPCR x <i>Nested</i> -PCR	Sensibilidade	100	75,3	100
	Especificidade	100	80,5	100
	VPP	100	75,3	100
	VPN	100	80,5	100
KK x Hoffman	Sensibilidade	90,9	58,7	99,8
	Especificidade	100	82,4	100
	VPP	100	69,2	100
	VPN	95	75,1	99,9

(VPP) Valor Preditivo Positivo; (VPN) Valor Preditivo Negativo.

A análise do coeficiente kappa determinou a concordância entre a infecção por cercária e os testes diagnósticos utilizados, sendo: boa para Hoffman ( $K = 0,667$ ;  $p < 0,001$ ), boa para Kato-Katz ( $K = 0,733$ ;  $p < 0,001$ ), ótima para *Nested-PCR* ( $K = 0,867$ ;  $p < 0,001$ ) e ótima correlação para Sm1-7qPCR ( $K = 0,867$ ;  $p < 0,001$ ). A concordância entre testes de mesma natureza foi de ótima para Hoffman e Kato-Katz ( $K = 0,927$ ;  $p < 0,001$ ) e perfeita para *Nested-PCR* e Sm1-7qPCR ( $K = 1$ ;  $p < 0,001$ ).

Estudos comparando diferentes técnicas para detecção da esquistossomose em diferentes amostras biológicas são realizados com o objetivo de implementar métodos diagnósticos combinados na rotina laboratorial. Fuss et al. (2018) apresentou sensibilidade de 96,84% para qPCR, comparado ao Kato-Katz, enquanto sua especificidade foi de 29,55% para amostras de humanos.

Diante destas abordagens estatísticas, analisou-se no nosso estudo o comportamento dos parâmetros epidemiológicos quando os animais foram submetidos à infecção controlada, relevando as verdadeiras limitações de cada técnica implementada, o qual destaca que a exposição dos camundongos às cercárias de *S. mansoni* e confirmação da infecção em ambiente monitorado garantem a constituição de um grupo de verdadeiros positivos, diferentemente de um inquérito populacional randomizado, como corroborado com Katz (2018).

Desta forma, as negatividades presentes em todas as técnicas empregadas podem ser justificadas por meio: (A) da resistência imunológica do animal, afetando o processo de infecção; e (B) pela baixa sensibilidade da técnica (ABATH et al., 2006; ENK, 2008).

A avaliação paralela dos testes de mesma natureza destaca os testes moleculares com índice kappa com maior concordância, contrapondo os exames coprocópicos. A alta sensibilidade até mesmo para PCR convencional foi documentada por Carvalho et al. (2012), que evidenciou sensibilidade de 98,7%, em comparação com o teste de Kato-Katz realizado em duplicata (20,80%). Apesar disso, a utilização de PCR em tempo real se sobressai às variações mais simples da ferramenta, devido ao tempo menor de reação, a automatização do processo de visualização do produto, detecção de concentrações mínimas de DNA em amostras biológicas, e a capacidade de quantificar o DNA alvo amplificado (NAVARRO, 2015).

## 6 CONCLUSÃO

- As extrações obtidas por meio de *kit* comercial devem ser priorizadas para garantir o bom funcionamento das técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico, a fim de que minimize os eventos de inibição de reações ou ampliações inespecíficas.
- A otimização do sistema Taqman® para Sm1-7qPCR se revelou como uma alternativa eficiente, capaz de detectar até 1 fg/μL de DNA de *S. mansoni* e sem grandes variações para triplicatas.
- A aplicação do sistema descrito por Espírito-Santo et al. (2014) nas amostras controladas foi bem-sucedida e obteve a maior sensibilidade do estudo (86,7%), em conjunto com a *Nested-PCR*, garantindo a concordância entre as técnicas ( $K = 1$ ). Entretanto, o teste de Kato-Katz, recomendado como “padrão-ouro”, apresentou resultados falsos negativos, com sensibilidade de 73,3%.
- A Sm1-7qPCR para aplicação no diagnóstico de esquistossomose se revela como uma ferramenta muito útil para fornecer suporte ao teste de Kato-Katz, principalmente em áreas de baixa endemicidade, onde os infectados apresentam baixa carga parasitária. No entanto, a aplicação da Sm1-7qPCR pode se tornar mais efetiva após a aplicação em maior amostragem para determinação da relação do Ct com a quantidade de ovos por grama de fezes.

## REFERÊNCIAS

ABATH et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **ResearchGate**, mar. 2006. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/7391669\\_Immunopathogenic\\_mechanisms\\_in\\_schistosomiasis\\_what\\_can\\_be\\_learned\\_from\\_human\\_studies](https://www.researchgate.net/publication/7391669_Immunopathogenic_mechanisms_in_schistosomiasis_what_can_be_learned_from_human_studies). Acesso em: 06 Abr. 2023.

AL-SHEHRI, H. *et al.* Surveillance of intestinal schistosomiasis during control: a comparison of four diagnostic tests across five Ugandan primary schools in the Lake Albert region. **Parasitology**, v. 145, n. 13, p. 1715–1722, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29560841/>. Acesso em: 1 fev. 2023.

ANDRADE, Z. A. A Patologia da Esquistossomose Humana. Em: **Schistosoma mansoni e esquistossomose**: uma visão multidisciplinar. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008

ANDRADE, Z. A. **Schistosomal Hepatopathy**. 1 ed. Rio de Janeiro: Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 2004. Disponível em: <https://memorias.ioc.fiocruz.br/article/3568/%3Ca%20href=>. Acesso em: 6 Abr. 2023.

ARIKAWA, E. et al. Cross-platform comparison of SYBR® Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. **BMC Genomics**, 11 jul. 2008. v. 9, n. 1. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-328>. Acesso em: 2 mai. 2023.

BARBOSA, C. S. et al. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. **Revista de Saúde Pública** [online]. 2000, v. 34, n.4, p.337-341. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/3y7hXVH9H5q3B6vMCQdDN7m/>. Acesso em 5 Abr 2021.

BARBOSA, C. S. et al. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, v. 53, n. 2, p. 110-114, 2017.

BARBOSA, C S et al. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 1998, v. 93, suppl 1, p. 265-266. Acesso em 5 Abr 2023.

BARBOSA, C. S., SILVA, C. B. e BARBOSA, F. S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Revista de Saúde Pública** [online]. 1996, v. 30, n. 6, p. 609-616. Disponível em: Acesso em 5 Abr 2023.

BELIZARIO, V. Y. *et al.* Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay and enzyme-linked immunosorbent assay in detecting *Schistosoma japonicum* in Siargao Island, Surigao del Norte, the Philippines. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106306, 2018, Jan. 2022. DOI 10.1016/j.actatropica.2022.106306. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35038427/>. Acesso em: 26 Jan. 2022.

BERHE, N. *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**, 1 nov. 2004. v. 92, n. 3, p. 205–212. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15533288/>. Acesso em: 15 mar. 2023.

BEZERRA, F. S. M.; FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C. Moluscos transmissores do *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. p. 247-256.

BOTES, M.; KWAADSTENIET, M. ; CLOETE, T. E.. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 1, p. 91–108, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23001336/>. Acesso em: 03 jan. 2023.

BRASIL. **Boletim epidemiológico**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no43>. Acesso em: 03 mai 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CAVALCANTI, M. G.; CUNHA, A. F. A.; PERALTA, J. M.. The Advances in Molecular and New Point-of-Care (POC) Diagnosis of Schistosomiasis Pre- and Post-praziquantel Use: In the Pursuit of More Reliable Approaches for Low Endemic and Non-endemic Areas. **Frontiers in Immunology**, 28 maio. 2019. v. 10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31191512/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

CARVALHO, G. C. *et al.* Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1 nov. 2012. v. 107, n. 7, p. 899–902. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/J6ySmtz4GcY7DT3FF7xrGtk/?lang=en>. Acesso em: 2 mai. 2023.

CLERINX, J.; ALFONS VAN GOMPEL. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 1 jan. 2011. v. 9, n. 1, p. 6–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21216199/>. Acesso em: 16 mar. 2023.

COSTA, Y. **Avaliação do potencial diagnóstico de métodos imunológico e molecular para diagnóstico da esquistossomose mansônica**. Fiocruz.br, 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/32367>. Acesso em: 14 Abr. 2023.

COUTINHO A. D., DOMINGUES ALC. Esquistossomose mansoni. In: Dani R, Castro LP (Eds). **Gastroenterologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan:1697-1728, 1993.

CNOPS, L. et al. Schistosoma real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants. **Tropical Medicine & International Health**, 12 ago. 2012. v. 17, n. 10, p. 1208–1216. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22882536/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

CREGO-VICENTE, B. et al. Application of a genus-specific LAMP assay for Schistosome species to detect *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* hybrids. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, p. 1-13, Mar. 2021. DOI/10.3390/jcm10061308. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33810080/> Acesso em 27 Jan. 2023.

CUNNINGHAM, L. J. et al. Developing a real-time PCR assay based on multiplex high-resolution melt-curve analysis: a pilot study in detection and discrimination of soil-transmitted helminth and schistosome species. **Parasitology**, v. 145, n. 13, p. 1733–1738, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30152296/>. Acesso em: 8 jan. 2023.

DEELDER, A. M. et al. Schistosoma mansoni: Demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. **Experimental Parasitology**, 1 out. 1976. v. 40, n. 2, p. 189–197. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014489476900813?via%3Dihub>. Acesso em: 21 abr. 2023.

DE JONGE, N. et al. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1991, v. 85, p. 756-759. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1801347/>. Acesso em 03 Mar 2023.

DOMINGUES, A. L. C.; FERRAZ, A. A. B. Doença Hepática Esquistossomótica. **Aparelho Digestivo: clínica e cirurgia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 1559-1575.

DUNN, J. C. et al. The increased sensitivity of qPCR in comparison to Kato-Katz is required for the accurate assessment of the prevalence of soil-transmitted helminth infection in settings that have received multiple rounds of mass drug administration. **Parasites & Vectors**, 24 jun. 2020. v. 13, n. 1. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04197-w>. Acesso em: 16 abr. 2023.

EASTON, A. V. et al. Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of mass deworming. **Parasites & Vectors**, 27 jan. 2016. v. 9, n. 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26813411/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

EISENSTEIN, B. I. The Polymerase Chain Reaction. **The New England Journal of Medicine**, 18 jan. 1990. v. 322, n. 3, p. 178–183. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199001183220307>. Acesso em: 2 mai. 2023.

ENK M. J., et al. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropical**. 2008; v. 108, n. 2-3, p. 222-228. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18973744/>. Acesso em: 22 mar. 2023.

ESPÍRITO-SANTO, M. C. C. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan® Real-Time PCR in a hamster model. **Experimental Parasitology**, 1 ago. 2014. v. 143, p. 83–89. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24858959/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

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**, v. 14, n. 1, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25338651/>. Acesso em: 8 jan. 2023.

ETTEN, L. V. et al. Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. **Journal of Clinical Microbiology**, 1 out. 1994. v. 32, n. 10, p. 2404–2406. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC264074/>. Acesso em: 10 Mai. 2023.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126–139, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16469371>. Acesso em: 8 jan. 2023.

FREDRICKS, D. N.; RELMAN, D. A. Application of Polymerase Chain Reaction to the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, 1 set. 1999. v. 29, n. 3, p. 475–486. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10530433/>. Acesso em: 16 mar. 2023.

FUSS, A. 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**, 22 ago. 2018. v. 13, n. 8, p. e0202499–e0202499. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30133490/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

FUSS, A.; MAZIGO, H. D.; MUELLER, A. Evaluation of serum-based real-time PCR to detect *Schistosoma mansoni* infection before and after treatment. **Infectious Diseases of Poverty**, 22 jun. 2020. v. 9, n. 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32571433/>. Acesso em: 9 abr. 2023.

GOMES, E. C. S., et al. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco-Brazil. **International Journal of Health Geographics**. 2012, v. 11, n. 51. Acesso em 5 Abr 2023.

GOMES, E. C. S.; JÚNIOR, W. L. B.; MELO, F. L. Evaluation of SmITS1-LAMP performance to diagnosis schistosomiasis in human stool samples from an endemic area in Brazil. **Experimental Parasitology**, 1 nov. 2022. v. 242, p. 108389–108389. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36206937/#full-view-affiliation-1>. Acesso em: 2 mai. 2023.

GOMES, E. C. de S.; LEAL-NETO, O. B.; DE OLIVEIRA, F. J. M.; *et al.* Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24559264/>. Acesso em: 8 jan. 2023.

GROBUSCH, M. P. et al. Imported Schistosomiasis in Europe: Sentinel Surveillance Data from TropNetEurop. **Journal of Travel Medicine**, 8 mar. 2003. v. 10, n. 3, p. 164–167. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12757691/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

HAMBURGER, J et al. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 73–80, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2011155/>. Acesso em: 8 jan. 2023.

HAWKINS, S.; GUEST, P. C. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. **Methods in molecular biology**, 29 nov. 2016. p. 125–133. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27896761/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

HE, P. J. et al. Real-time PCR diagnosis of *Schistosoma japonicum* in low transmission areas of China. *Infectious Diseases of Poverty*, 31 jan. 2018. v. 7, n. 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29394958/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

HOFFMAN, W. A., PONS, J. A. JANER, J. L. The Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis Mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 5, n. 2, 283-289, 1934. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1406307](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1406307). Acesso em: 16 Abr. 2023.

JAURÉGUIBERRY, S.; PARIS, L.; CAUMES, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, 1 mar. 2010. v. 16, n. 3, p. 225–231. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20222897/>. Acesso em: 7 mai. 2023.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses**. Repositório Institucional da Fiocruz, 2018. v. 1, n. 1. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662>. Acesso em: 2 maio 2023.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1972. v. 14, n. 6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4675644/>. Acesso em: 3 Abr. 2023.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**, 1. ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul: Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência - Editora UFSM, 2017, p. 106.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28210243/>. Acesso em: 7 jan. 2023.

LAMBERTUCCI, J. R. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, 11 abr. 2014. v. 47, n. 2, p. 130–136. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/GCyVq99PNDxdYYMJmjGrZvn/?lang=en>. Acesso em: 8 Abr. 2023.

LEVECKE, B. et al. A Comparison of the Sensitivity and Fecal Egg Counts of the McMaster Egg Counting and Kato-Katz Thick Smear Methods for Soil-Transmitted Helminths. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14 jun. 2011. v. 5, n. 6, p.

e1201–e1201. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21695104/>. Acesso em: 13 mar. 2023.

LIU, J. et al. A Laboratory-Developed TaqMan Array Card for Simultaneous Detection of 19 Enteropathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 472–480, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23175269/>. Acesso em: 6 jan. 2023.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, 1 mar. 2004. v. 10, n. 3, p. 190–212. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>. Acesso em: 13 mai. 2023.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, 9 ago. 2018. v. 4, n. 1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-018-0013-8>. Acesso em: 8 jul. 2023.

MELO, F. L. et al. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 11, Nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.12.008>. Acesso em: 19 Jan. 2023.

NASCIMENTO, I. M. E.; MEIRELLES, L. M. A. Análise do perfil epidemiológico da esquistossomose no Nordeste do Brasil. **Research, Society and Development**, 27 nov. 2020. v. 9, n. 11, p. e58591110022–e58591110022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10022/9132>. Acesso em: 14 Abr. 2023.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, 15 jan. 2015. v. 439, n. 15, p. 231–250. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898114004483?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jul. 2023.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

NOYA, O. et al. Schistosomiasis in America. **Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 11–43, 2015. DOI 10.1007/978-3-7091-1422-3\_2. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1422-3\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1422-3_2). Acesso em: 5 Jan. 2023.

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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817603/>. Acesso em: 8 jan. 2023.

OLIVEIRA, E.; HERMÍNIA Y. K.; DANIELLE M. L. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 1 jul. 2005. v. 100, n. 4, p. 421–425. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16113891/>. Acesso em: 12 abr. 2023.

PEDROSA, E. L. C. et al. AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS NO DIAGNÓSTICO DE PARASITOLOGIA. **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa** 3, v. 3, p. 59–66, 2019. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/ciencias-biologicas-campo-promissor-em-pesquisa-3>. Acesso em: 22 mar 2023.

PEREIRA, J. B. et al. Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3681–3697, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/2623>. Acesso em 27 Abr. 2023.

POMARI, E. et al. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 1510-1516, Jun. 2019. DOI/10.1016/j.cmi.2019.06.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226445/>. Acesso em 27 Abr. 2023.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1 fev. 2002. v. 66, n. 2, p. 157–162. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12135287/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

POSADA-MARTÍNEZ, E. L. Esquistossomose e o Coração - Em Nome das Doenças Tropicais Negligenciadas e Outras Doenças Infeciosas que Afetam o Coração (Projeto NET-Heart). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/DtmLzJHhBGCyjsbNXddCNQz/?lang=pt>. Acesso em: 14 fev. 2023.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

RICHARD, L. J.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977. Disponível em: [https://www.jstor.org/stable/2529310?seq=7#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/2529310?seq=7#metadata_info_tab_contents). Acesso em: 18 abr. 2023.

ROSS, A. G. et al. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, 18 abr. 2002. v. 346, n. 16, p. 1212–1220. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11961151/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SAMBROOK, JAMES. et al. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS et al. Perfil clínico e critérios diagnósticos da mielorradiculopatia esquistossomótica. **Arquivos De Neuro-psiquiatria**, 1 set. 2001. v. 59, n. 3B, p. 772–777. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/NxVsQ6Bkt5CXFSBbmSN4vHK/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO. **Boletim técnico**: esquistossomose. Disponível em: <https://www.cievspe.com/informacoes-estrategicas>. Acesso em: 21 Jun 2023.

SILVA-MORAES, V. et al. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 1 jan. 2019. v. 114. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/Mz5Vv84MVZytnFwHSRS9c6z/?lang=en>. Acesso em: 13 abr. 2023.

SIQUEIRA, L. M. V. et al. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, 1 jun. 2016. v. 49, n. 3, p. 341–347. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/vFpsY6rgpwxSD3xGHNcx9mQ/?lang=en#>. Acesso em: 2 mai. 2023.

SOBRINHO, F. et al. Incidência de Esquistossomose Mansônica no Nordeste brasileiro, no período de 2013 a 2017. **Diversitas Journal**, 27 out. 2020. v. 5, n. 4, p. 2881–2889. Acesso em: 7 jul. 2023.

TAYLOR, C. et al. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **Biochemical Journal**, 15 abr. 1993. v. 291, n. 2, p. 493–504. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1132552/>. Acesso em: 2 mai. 2023.

TAJADINI, M.; PANJEHPOUR, M.; JAVANMARD, S.. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 85, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24761393/>. Acesso em: 5 fev. 2023.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-time PCR: understanding Ct**. Disponível em:

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>. Acesso em: 10 mai. 2023.

UTZINGER, J., et al New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clinical microbiology and infection**: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2015, v. 21, n. 6, p. 529–542. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25843503/>. Acesso em 17 Abr. 2023.

VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; *et al*. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 342–346, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19195671/>. Acesso em: 29 jan. 2023.

VITORINO, R. R. et al. **Schistosomiasis mansoni: diagnosis, treatment, epidemiology, prophylaxis and control**. Revista Brasileira De Clínica Médica, fev. 2012. v. 10, n. 1, p. 39–45. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2012/v10n1/a2676.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2023.

WHO. **Guideline on control and elimination of human schistosomiasis**. 1. ed.: World Health Organization, 2022. V. 1. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240041608>. Acesso em: 9 jul. 2023.

WHO. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis**: report of a WHO expert committee. Who.int, 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42588>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WHO. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals**. 1. ed.: World Health Organization, 2021. V. 1. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acesso em: 15 Ago. 2023.

WIRIA, A. E; PRASETYANI, M. A.; HAMID, F.; *et al*. Does treatment of intestinal helminth infections influence malaria? Background and methodology of a longitudinal study of clinical, parasitological and immunological parameters in Nangapanda, Flores, Indonesia (ImmunoSPIN Study). **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, 2010.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Cópia do parecer do Comitê de Ética No Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM)



#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

##### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**Manutenção de cepas de *Schistosoma mansoni* para pesquisas científicas**” protocolado sob nº 173/2021 pela pesquisadora **Elaine Christine de Souza Gomes**, está de acordo com a Lei 11.794/2008 do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem **validade até 31 de março de 2026** com a finalidade de **pesquisa científica**. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA sobre acidentes ou intercorrências com os animais, bem como a necessidade de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados								
Animal	Espécie e linhagem	Quant. (total)	Sexo			Idade	Peso	Origem
			♂	♀	Ambos			
Camundongo heterogênico	<i>Mus musculus</i> . Linhagem: <i>Swiss webster</i>	1.920			X	7-8 semanas	30-40 gramas	Biotério
<b>Total</b>		<b>1.920</b>						

Recife, 08 de março de 2022

Virgínia Maria Barros de Lorena  
Coordenadora CEUA/IAM  
Mat. Siape 1984445