



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

**OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMÍASE
MANSÔNICA EM ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE**

Candida Fagundes Teixeira

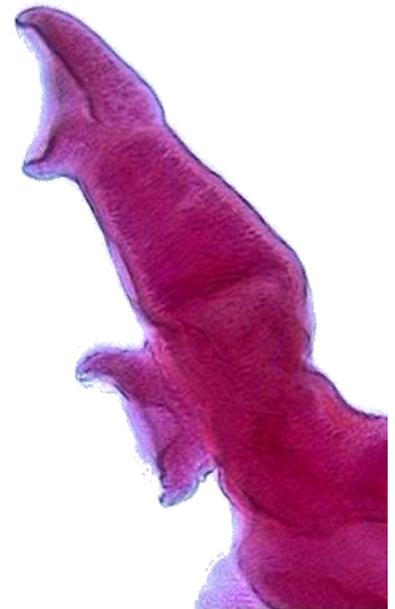
PORTO ALEGRE
2011



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

**OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA
ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA EM ÁREAS DE
BAIXA ENDEMICIDADE**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul



Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira

Aluna: Candida Fagundes Teixeira

PORTO ALEGRE

Maio 2011

AGRADECIMENTOS

Como em todos os momentos de minha existência, agradeço primeiramente à Deus, pelas oportunidades que Ele coloca em nossas vidas e que soubemos aproveitar e evoluir com elas. O envolvimento neste trabalho definitivamente foi uma dessas oportunidades, uma experiência que contribuiu muito para meu crescimento profissional, assim como para minha evolução pessoal.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho:

Aos meus colegas e amigos do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, pela amizade, carinho, momentos de descontração e aos ensinamentos. Um agradecimento especial aqueles que empenharam-se na busca incessante de ovos de *S. mansoni*, e contribuíram diretamente para o andamento dos meus experimentos, assim como aqueles que foram doadores de amostra!

Ao meu orientador Dr. Carlos Graeff-Teixeira, pela orientação durante todo o trabalho, assim como pela amizade, paciência com minhas milhões de dúvidas e incertezas, pelo incentivo e conhecimento transmitido nestes anos de convívio.

Ao Dr. Octávio Fernandes, pela colaboração neste trabalho, durante o período em que estive no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED) do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ), ao Dr. Adeílton Brandrão Chefe do LIPMED e um agradecimento especial à Dra. Aline Caseca Cardoso Volotão pelo apoio, orientação e amizade.

À Sandra Drummond, integrante do Programa de Controle de Esquistossomose da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais e ao Sidnei do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas – FIOCRUZ/RJ pela doação de amostras de fezes para execução deste trabalho.

Agradeço especialmente a duas pessoas muito importantes para mim, minha irmã Cacília, que desde o princípio acompanhou minha trajetória neste trabalho, e muitas vezes dedicou seu tempo para me auxiliar.

E meu esposo, amigo e companheiro Rodrigo. Agradeço pelo seu amor, apoio, compreensão e dedicação. Muitas vezes foi meu porto seguro, me dando força para superar as dificuldades, e ânimo para enfrentar a rotina de trabalho, plantões e estudo.

Mesmo sendo de outra formação profissional, estive sempre pronto para me auxiliar, no começo com alguma dificuldade para entender o que eu estava fazendo, mas no final já estava participando dos meus momentos de dúvida, angústia, e é claro vibrando junto comigo a obtenção de resultados positivos.

Não poderia deixar de agradecer também a todos meus amigos e familiares que me apoiaram e principalmente acreditaram no meu potencial para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Em focos de introdução recente da esquistossomíase, como Esteio na região metropolitana de Porto Alegre, a parasitose ocorre com baixas prevalências e cargas parasitárias, resultando em dificuldades para o diagnóstico parasitológico, em virtude da sensibilidade inadequada dos métodos clássicos. O principal objetivo deste trabalho foi otimizar o desempenho de métodos de diagnóstico, em situações que os ovos nas fezes são um evento raro. A estratégia foi examinar grandes quantidades de fezes, o que resultou na descrição e avaliação de um novo método de diagnóstico para detecção de ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes denominado Helmintex. Este é um método de concentração, onde as fezes passam por uma sequência de sedimentação espontânea, tamisagem, centrifugação com acetato de etila (Ritchie) e uma etapa final onde os ovos são isolados através de interação com partículas paramagnéticas em um campo magnético. Após a concentração, na etapa de detecção dos ovos todo o sedimento resultante é analisado através de microscopia óptica. Na segunda etapa deste trabalho o objetivo foi avaliar o desempenho da PCR em tempo real (tecnologia *Taqman*) como alternativa de método de detecção no sedimento final do Helmintex, substituindo a análise microscópica. Para realização da primeira etapa, ovos de *S. mansoni* foram adicionados em 30 g de fezes negativas para a infecção, formando suspensões de 0,1 a 1,34 ovos por grama de fezes (opg), e as fezes foram submetidas a todas as etapas de concentração do método. Para cada suspensão testada foi encontrado pelo menos 1 ovo em 20% (0.1 opg); 50% (0.24); 50% (0.34); 60% (0.67); 80% (1.0) e 100% (1.34) das tentativas testadas para cada suspensão. Para a avaliação do desempenho da PCR, "primers" e sonda para o gene da citocromo-C oxidase subunidade 1 foram desenhados para a amplificação do DNA de *S. mansoni*. Para a extração do DNA foram avaliados 4 protocolos diferentes. Foram preparadas suspensões de ovos em água destilada e fezes, contendo 1, 10, 20, 40 e 80 ovos. E amostras de 1000 ovos foram extraídas para a construção de uma curva padrão da estimativa de concentração de DNA, para verificação do limite de detecção da reação. A amplificação do DNA do parasito pode ser vista em todas as suspensões testadas, inclusive a que continha 1 ovo. Dos 4 protocolos de extração avaliados, o *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), um kit de extração comercial, foi o que apresentou o melhor rendimento. A curva padrão construída a partir de 1000 ovos apresentou um limite de detecção de 1 pg com reprodutibilidade de 13,8%. Considerando 100% de reprodutibilidade, a reação apresentou limite de detecção de 100 pg. O novo método Helmintex descrito neste trabalho representa grande avanço no diagnóstico da esquistossomíase em infecções com baixas cargas parasitárias, além disso, apresentam-se 2 opções de métodos de detecção (visualização microscópica e amplificação de DNA dos ovos pela PCR em tempo real). Estes avanços contribuem para o esforço em curso de reduzir mundialmente a morbidade e a disseminação das áreas de transmissão das esquistossomíases.

Palavras-chave: diagnóstico – ovos - esquistossomíase

ABSTRACT

Classical parasitological methods are not sensitive enough to detect most of the infected individuals in low intensity transmission areas like in Esteio, Rio Grande do Sul. To optimize methods for detection of eggs in feces, when they are rare events, the strategy was to examine large amounts of feces. A novel diagnostic method for isolation of *Schistosoma mansoni* eggs in feces, and an initial evaluation of its performance is now reported. Helmintex is a concentration method with sequential steps of spontaneous sedimentation, sieving, ether-acetate centrifugation method (Ritchie) and a final step where eggs are isolated through interaction with paramagnetic beads in a magnetic field, and the sediments retained at the wall are collected and examined under a microscope. The objective of the second part of the investigation was to evaluate *TaqMan* Real Time PCR as an alternative for microscopic analysis as the detection procedure for final sediment resulting from Helmintex. To evaluate the new concentration method, *S. mansoni* eggs were added to 30 grams of normal feces to produce suspensions ranging from 0.1 to 1.34 eggs per gram of feces (epg) and the feces were submitted to all steps of concentration method. All the sediment was analysed by light microscopy and at least 1 egg was found in 20% (0.1 epg); 50% (0.24); 50% (0.34); 60% (0.67); 80% (1.0) and 100% (1.34) of the seeding experiments. For evaluation of the *TaqMan* Real Time PCR as an alternative for detection of eggs in feces after the concentration Helmintex method, primers and probe targeting the cytochrome-C oxidase subunit 1 gene were designed for amplification *S. mansoni* specific DNA. Four procedures for DNA extraction were evaluated. Suspensions in distilled water and feces were prepared containing 1, 10, 20, 40 and 80 eggs. *S. mansoni* DNA was extracted from 1000 eggs for determination of a standard curve to estimate the DNA concentration and determine the limits of the detection. DNA was amplified from all the spiked egg suspensions, including the samples with only 1 egg. *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) presented the best extraction performance. The standard curve for DNA concentration from 1000 eggs had a detection limit at 1 pg but with 13.8 % of the reproductibility and 100 pg at 100 % of reproductibility. The novel *S. mansoni* detection method, named Helmintex may significantly improve diagnosis of infections with low intensity of infection, with two alternatives for the detection step: microscopic analysis and Real Time PCR. Improved diagnostic methods are a main stem in the current worldwide efforts to reduce morbidity of schistosomiasis and its dissemination.

Key Words: diagnosis - eggs – schistosomiasis

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius
CAA - antígeno anódico circulante
CCA - antígeno catódico circulante
cm - centímetro
Ct – *cycle threshold*
Cox 1 – citocromo oxidase subunidade 1
DNA - Ácido desoxirribonucléico
ELISA - Ensaio imunoenzimático
EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético
FD- *Fast DNA Kit*
fg- fentograma
FRET - *fluorescence resonance energy transfer*
g - grama
h - hora
HPJ – Hoffman, Pons e Janer
IgM – imunoglobulina M
IgG – imunoglobulina G
IFI - imunofluorescência indireta
KK – Kato-Katz
MGB - *Mino Groove Binder*
mg . miligrama
mL . mililitro
mM – milimolar
µg . micrograma
µL – microlitro
M - molaridade
min – minuto
mm - milímetro
ng- nanograma
opg – ovos por grama de fezes

pb – pares de base
PBS – tampão fosfato salínico
PCE- Programa de Controle da Esquistossomose
PCR – reação em cadeia da polimerase
pg- picograma
pH – potencial de hidrogênio
PS- *Pitcher* (1989) e Silva (1999) com modificações
QG- *QIAamp DNA Stool Mini Kit*
qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA - Ácido ribonucléico
S/dil- Sem diluição
SEA – antígeno solúvel de ovo
seg - segundo
TC- *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit*
TIGR - *The Institute for Genomic Research*
Tris.- Tri (hidroximetil) aminometano
TE – tampão Tris-EDTA
TBE – tampão Tris-borato-EDTA
V - volts
v/v- volume por volume
x g - Força gravitacional
WB - Western-blot

SUMÁRIO

| | pg |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1.1 - INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1.1 - O PARASITO | 3 |
| 1.1.2 - CICLO BIOLÓGICO | 4 |
| 1.1.3 - FORMAS CLÍNICAS | 5 |
| 1.1.4 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA EPIDEMIOLOGIA | 9 |
| 1.1.5 - DIAGNÓSTICO | 11 |
| 1.2 - JUSTIFICATIVAS | 21 |
| 1.3 - OBJETIVOS | 23 |
| 1.3.1 – OBJETIVO GERAL | 23 |
| 1.3.2 – OBJETIVOS EPECÍFICOS | 23 |
| CAPÍTULO 2 | 25 |
| 2.1- MATERIAS E MÉTODOS | 26 |
| 2.1.1-PARASITO | 26 |
| 2.1.2 - DIGESTÃO DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS | 26 |
| 2.1.3 - CONCENTRAÇÃO DE OVOS <i>S. MANSONI</i> ATRAVÉS DE COLUNA DE SACAROSE | 27 |
| 2.1.4 - IMUNIZAÇÃO DOS COELHOS | 27 |
| 2.1.5 - IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SUPERFÍCIE DE OVO DE <i>S. MANSONI</i> | 28 |
| 2.1.6 - SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DOS OVOS DE <i>S. MANSONI</i> | 28 |
| 2.1.7 - SEPARAÇÃO MAGNÉTICA UTILIZANDO LECTINAS COMO LIGANTES NA REAÇÃO | 29 |
| 2.1.8 - PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DE OVOS NAS FEZES EM MULTIPLAS ETAPAS E ISOLAMENTO DOS OVOS POR INTERAÇÃO COM PARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS | 31 |
| 2.2 - RESULTADOS | 32 |
| 2.2.1 - SEPARAÇÃO DOS OVOS DE <i>S. MANSONI</i> POR COLUNA DE SACAROSE | 32 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2 - IMUNIZAÇÃO DOS COELHOS E SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DOS OVOS DE <i>S.MANSONI</i> | 33 |
| 2.3 - ARTIGO CIENTÍFICO..... | 37 |
| CAPÍTULO 3 | 43 |
| 3.1 - MATERIAIS E MÉTODOS..... | 44 |
| 3.1.1 - PCR CONVENCIONAL SEGUNDO PONTES, 2002..... | 44 |
| 3.1.2 - PCR EM TEMPO REAL (QPCR) SEGUNDO HOVE, 2008..... | 45 |
| 3.1.2.1- MATERIAL BIOLÓGICO..... | 45 |
| 3.1.2.2- EXTRAÇÃO DE DNA DOS OVOS DE <i>S. MANSONI</i> | 47 |
| 3.1.2.3- PCR EM TEMPO REAL..... | 51 |
| 3.1.2.4- CURVA PADRÃO DE CONCENTRAÇÃO DE DNA DE <i>S.</i> <i>MANSONI</i> | 53 |
| 3.1.2.5- PCR CONVENCIONAL..... | 53 |
| 3.2 - RESULTADOS..... | 54 |
| 3.2.1- PCR CONVENCIONAL SEGUNDO PONTES, 2002..... | 54 |
| 3.2.2- PCR EM TEMPO REAL SEGUNDO HOVE, 2008..... | 54 |
| 3.2.2.1 - RESULTADOS DO GRUPO DE EXPERIMENTOS 1..... | 54 |
| 3.2.2.2 - RESULTADOS DO GRUPO DE EXPERIMENTOS 2..... | 57 |
| 3.2.2.3 - RESULTADOS DO GRUPO DE EXPERIMENTOS 3..... | 58 |
| 3.2.2.4 - RESULTADOS DO GRUPO DE EXPERIMENTOS 4..... | 61 |
| 3.2.2.5- DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE..... | 62 |
| 3.2.2.6 DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA..... | 62 |
| 4.0 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 64 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 72 |

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

As esquistossomíases, denominadas também esquistossomoses ou bilharzioses, são infecções produzidas por trematódeos do gênero *Schistosoma* que, para o homem, têm como principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayaensis*, mas somente uma destas espécies existe no Brasil, o *S. mansoni* (Coura, 2004). A infecção por *Schistosoma* foi descrita pela primeira vez por Theodore Bilharz em 1852, por isso a infecção também ser conhecida por bilharziose, que descreveu um parasito intravascular para o qual deu o nome de *Distoma haematobia*. Em 1858, o gênero passou a ser chamado *Schistosoma*, modificação realizada por Weinland, em virtude de o macho apresentar o corpo fendido (*schisto*= fenda; *soma*= corpo), sendo este gênero aceito até os dias atuais (Neves, 1997). Em 1902, Patrick Manson identificou nas fezes de um enfermo, ovos de espículo lateral, diferente dos ovos comumente encontrado na urina de pacientes infectados, surgindo à hipótese de existência de nova espécie de *Schistosoma*. Foi então em 1907 que Sambon propôs a nova espécie e a denominou de *S. mansoni*. A espécie foi descrita detalhadamente pela primeira vez no Brasil em 1908, descoberta por Pirajá da Silva na Bahia (Coura, *et al* 2004). A infecção é também chamada esquistossomíase intestinal, pela localização dos parasitos na veia porta, ramo principal da veia mesentérica e nas vênulas da parede do grosso intestino, sigmóide e reto, com sintomas predominantemente intestinais. Nas formas mais graves há hepatoesplenomegalia, hipertensão no sistema porta ou outras manifestações patológicas (Rey, 2001).

A esquistossomíase mansônica é uma doença parasitária de caráter endêmico que tem a água como meio de transmissão. O principal hospedeiro intermediário é um molusco da família Planorbidae (*Biomphalaria sp.*), sendo o homem seu principal

hospedeiro definitivo. Desta maneira, a doença tem intrínseca correlação com a exposição de pessoas a águas contaminadas em banhos de rios ou em águas paradas. A doença é um indicativo sócio-econômico importante, estando relacionada com a pobreza e falta de saneamento básico. A magnitude de sua prevalência e gravidade das formas clínicas complicadas confere a esquistossomíase mansônica um grande destaque (Hinrichsen, 2005).

1.1.1 - O PARASITO

O habitat dos vermes adultos é o sistema portal-hepático, principalmente a veia porta e a mesentérica inferior. Sua longevidade é, em geral, de três a cinco anos, podendo chegar a 25 anos. A fêmea é mais fina e longa, medindo entre 1,2 a 1,6 cm de comprimento. O macho é mais curto e robusto, seu corpo na extremidade posterior se apresenta achatado dorsoventralmente e ao se curvar lateroventralmente sobre a fêmea, forma um canal central denominado ginecóforo, onde se aloja a fêmea. Ambos os sexos apresentam ventosas (oral e ventral) que lhe permitem se fixar nas paredes dos vasos (Hinrichsen, 2005).

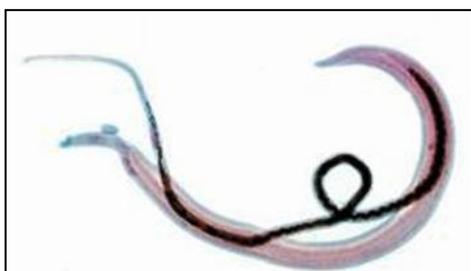


Figura 1- Verme de *S. mansoni*, detalhando a fêmea dentro do canal ginecóforo do macho (Kayser, 2005)

1.1.2 - CICLO BIOLÓGICO

Esta espécie (*S. mansoni*), única de interesse médico e sanitário nas Américas, desenvolve sua fase adulta como parasito da luz dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos, migrando as fêmeas para ovipor nas ramificações mais finas das veias mesentéricas. Os ovos que atravessarem a mucosa intestinal e forem evacuados com as fezes, e que cheguem a alguma coleção de água doce, eclodem e libertam suas larvas ou miracídios. Estes nadam em círculos durante algumas horas até encontrar seu hospedeiro intermediário, *B. glabrata*. Dentro dos caramujos, os miracídios se dividem e, após algumas semanas, liberam na água formas larvais chamadas cercárias. Estas nadam ativamente até entrar em contato com a pele de um hospedeiro vertebrado para penetrar, ganhar a circulação geral e alojar-se no sistema porta intra-hepático (Rey, 2001).

Como foi mostrado no ciclo biológico, existem vários estágios do parasito que podem interferir na patogenia da doença, onde outros fatores têm importância. Entre estes devem ser destacados: carga parasitária, cepa ou linhagem do parasito, estado nutricional, idade e nível da resposta imune do paciente. Todos têm participação na gênese da doença, que será mais ou menos grave, dependendo da interação entre eles. Entretanto, os níveis da carga parasitária e da resposta imune dos pacientes podem ser considerados como os principais (Neves, 2006).

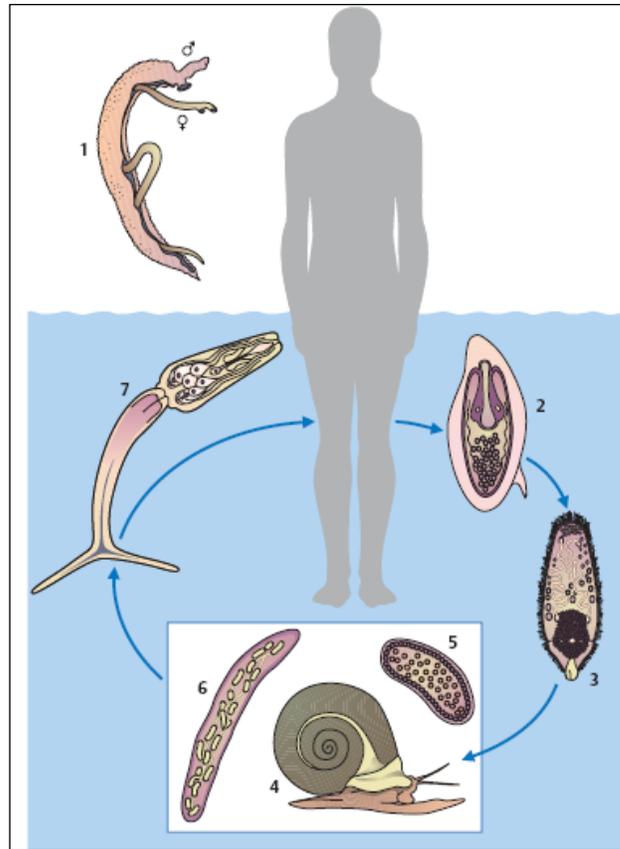


Figura 2- Ciclo Biológico do *S. mansoni* (Kayser, 2005).

1.1.3 - FORMAS CLÍNICAS

FASE INICIAL

Dermatite Cercariana

A fase inicial caracteriza-se pela fase cutânea ou cercariana. Esta tem início com a penetração das cercárias na pele, desenvolvendo um quadro de dermatite cercariana, que surge nos primeiros 10-15 min, permanecendo por 24 a 72 h; é caracterizada por prurido, erupção urticariforme, eritema, edema e dor, uma manifestação de hipersensibilidade que ocorre principalmente nas reinfecções. É um processo

imunoinflamatório, onde as imunoglobinas de classe E, mastócitos, complemento e eosinófilos têm grande participação (Neves, 2006). O diagnóstico nessa fase é difícil e o tratamento, se necessário, pode ser feito com anti-histamínicos, corticosteróides tópicos e esquistossomicidas nas doses habituais (Lambertucci *et al* 2005).

Esquistossomíase Aguda

Esta fase da doença evolui de forma inaparente ou assintomática na maioria dos indivíduos, quando esta se encontra na forma aguda sintomática (fase toxêmica) ora se apresenta em estágio clínico único, ora se diferencia em duas fases, uma pré e outra pós postural, podendo apresentar-se com quadro clínico pouco sintomático, moderado, grave a complicado. Os sintomas surgem três a quatro semanas após a infecção e incluem: mal-estar, febre, hiporexia, tosse seca, sudorese, dores musculares, dor na região do fígado ou intestino, diarreia, cefaléia, prostração, entre outros. A intensidade dos sintomas aumenta com o início da oviposição, o paciente apresenta-se abatido, com hepatomegalia, e esplenomegalia dolorosas, taquicardia e hipotensão arterial. O diagnóstico clínico só se define após 45 dias de infecção, quando ovos viáveis dos vermes se encontram nas fezes, ou quando a biópsia hepática revela o granuloma esquistossomótico na fase necrótico-exsudativa. Os sintomas e sinais clínicos podem persistir por mais de 90 dias e a doença se enquadrar na definição de febre de origem indeterminada. Há geralmente remissão espontânea do quadro clínico nos casos não tratados. A doença raramente mata. A melhora clínica é anunciada pela normalização da temperatura corporal e o desaparecimento dos sintomas digestivos. O fígado e o baço diminuem de tamanho progressivamente (Lambertucci *et al* 2005).

FASE CRÔNICA

Fase intestinal e hepatointestinal

Os indivíduos que evoluem para esta fase da doença, geralmente apresentam modulação satisfatória do granuloma, ou seja, o granuloma necrótico-exsudativo da fase aguda transforma-se em um granuloma pequeno com menor número de células inflamatórias, sem área de necrose em torno dos ovos e maior deposição de fibras colágenas. São consideradas formas leves da doença as formas intestinal e hepatointestinal. A maioria dos indivíduos que vive em áreas endêmicas apresentam essa forma da doença. A forma hepatointestinal representaria a forma intermediária da doença para a forma hepatoesplênica. Os indivíduos nesta fase da doença não apresentam sintomas e o diagnóstico se torna acidental. Nos indivíduos com queixas clínicas a sintomatologia é variável e inespecífica: desânimo, indisposição, tonturas, cefaléias e sintomas distônicos. Entre os sintomas digestivos: sensação de plenitude, flatulência, dor epigástrica, e hiporexia. Observam-se surtos diarreicos, por vezes disenteriformes, intercalados com constipação intestinal crônica. Esse quadro clínico não difere do encontrado em indivíduos sem a doença (Lambertucci *et al* 2005).

Esquistossomíase hepatoesplênica

A esquistossomíase hepatoesplênica se apresenta de duas formas: compensada e descompensada. Dados obtidos de inquéritos epidemiológicos revelaram que 2 a 7% dos indivíduos infectados apresentam essa forma da doença em áreas de alta endemicidade (Lambertucci *et al* 2005).

Forma Compensada: representa o modelo da esquistossomíase hepática avançada; tem como característica fundamental a presença de hipertensão portal, levando á esplenomegalia e ao aparecimento de varizes no esôfago. Os sinais e sintomas são inespecíficos em geral, às vezes o primeiro sinal é a hemorragia digestiva, e devido a isso aparecimento de anemia. O estado funcional do fígado se encontra preservado, sem evidências da insuficiência hepática. O diagnóstico desta fase em indivíduo em hospital bem aparelhado não é difícil, porém diagnosticar a forma hepatoesplênica em indivíduos em área endêmica (com base na presença do baço palpável e ovos de vermes nas fezes) representa um problema, devido alguns desses indivíduos apresentarem o baço aumentado secundário a outras doenças, dificultando o diagnóstico diferencial (Lambertucci *et al* 2005).

Forma Descompensada: esta forma caracteriza-se por diminuição acentuada do estado funcional do fígado. Esta descompensação está relacionada com os surtos de hemorragia digestiva e conseqüente isquemia hepática e fatores associados (hepatites virais e alcoolismo). A ascite encontra-se entre as manifestações mais comuns, iniciando-se frequentemente após hemorragia digestiva alta. A icterícia pode ser encontrada em alguns casos; os sinais e sintomas de encefalopatia hepática geralmente surgem após sangramentos digestivos, e quando presentes, respondem ao tratamento adequado ou evoluem para o coma hepático e a morte (Lambertucci *et al* 2005).

Outras lesões também podem ocorrer nessa fase da doença, quando os ovos são levados para outros órgãos, podendo provocar lesões cardiopulmonares, renais e neurológicas e algumas vezes tumorações esquistossomóticas no intestino (Rey, 2001).

1.1.4 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA

Infecção autóctone da África, onde seus maiores focos se encontram no Delta do Nilo e na faixa intertropical ao sul do Saara, a esquistossomíase mansônica é encontrada em todos os países daquele continente. Na Ásia também apresenta alguns focos de transmissão. Nas Américas, se implantou inicialmente nos territórios coloniais onde as metrópoles basearam a economia na exploração escravagista, importando mão-de-obra africana. Nestes, sempre que a presença de moluscos suscetíveis e as demais situações ecológicas favorecessem o ciclo evolutivo dos parasitos, instalou-se a endemia (Rey, 2001).

A esquistossomíase é considerada uma infecção parasitária de grande prevalência e apresenta significantes consequências na saúde pública e economia. Mundialmente, é estimado 207 milhões de pessoas infectadas para todas as espécies, destas, 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões apresentam a forma severa da doença. Estima-se ainda que 779 milhões de pessoas vivam em áreas de risco. (Enk *et al*, 2010; Chitsulo *et al*, 2000).

O *S. mansoni* é endêmico em 52 países e territórios, distribuídos na América do Sul, Caribe, África e leste do Mediterrâneo. Constituindo grande problema de saúde pública, esta endemia está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para a agricultura, trabalho doméstico e lazer (Katz *et al*, 2000). No Brasil a área endêmica estende-se atualmente numa faixa de terras contínuas ao longo de quase toda a costa litorânea, abrangendo em sua totalidade 19 Unidades Federadas com aproximadamente 25 milhões de habitantes expostos ao risco e 6 milhões de infectados (Ministério da Saúde, 2010; WHO, 2009). As áreas de maior prevalência se encontram nos Estados do Nordeste e do Sudeste, que segundo dados da Organização Mundial

de Saúde, até 1920 a infecção era limitada a esta região, devido o trabalho de escravos oriundos da África, em plantações de cana de açúcar. Depois disso, a doença começou a espalhar-se para outras regiões, em virtude do movimento migratório estimulado pelo desenvolvimento, e desde então novos focos foram sendo detectados até os dias atuais (WHO, 2001). Novos focos podem surgir, de forma temporária ou não, como por exemplo, ao longo da costa em direção à Amazônia. Isto pode significar a expansão da área de ocorrência da parasitose. No sul, tais focos isolados e não-estáveis já foram detectados no Paraná (Curitiba, Uraí, Jacarezinho, Santo Antônio da Platina, Jataizinho e Porecatu) e em Santa Catarina (São Francisco do Sul, Araquari, Massaranduba, Jaguará do Sul, Joinville) (Rey, 1991; Schlemper Júnior *et al.*, 1996). No Rio Grande do Sul o primeiro caso autóctone da doença foi descoberto em janeiro de 1997, onde foi diagnosticado ovos de *S. mansoni* em um paciente hospitalizado no município de Sapucaia e residente em Esteio (Graeff-Teixeira *et al*, 1999).

A investigação epidemiológica não conseguiu confirmar o local de aquisição do parasito, entretanto permitiu identificar pela primeira vez no Rio Grande do Sul, na coleção de água que o indivíduo costumava coletar iscas para pescaria, a *Biomphalaria glabrata*. Um grande número de caramujos pode ser examinada pela equipe do Dr. Omar Carvalho (Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte), sem que tenha sido encontrado hospedeiro infectado (Carvalho *et al*, 1998).

Em março de 1998, iniciou-se o exame parasitológico de caramujos coletados nos locais frequentados pelos dois primeiros indivíduos encontrado infectados, denominado “Banhado do Azeite”. Nos lotes examinados foram identificadas cercárias, que, inoculadas em camundongos albinos, produziram vermes adultos de *S. mansoni* (Graeff-Teixeira *et al*, 1999). Estava documentado o foco mais meridional nas Américas, da esquistossomíase mansônica. A detecção provavelmente é de introdução

recente e com epidemiologia peculiar. Nesta situação, métodos sorológicos combinando alta sensibilidade com boa especificidade são necessários, por apresentar melhor desempenho que o exame parasitológico de fezes e maior facilidade operacional para triagem e monitoramento da infecção humana (Alarcón-de-Noya *et al*, 1997).

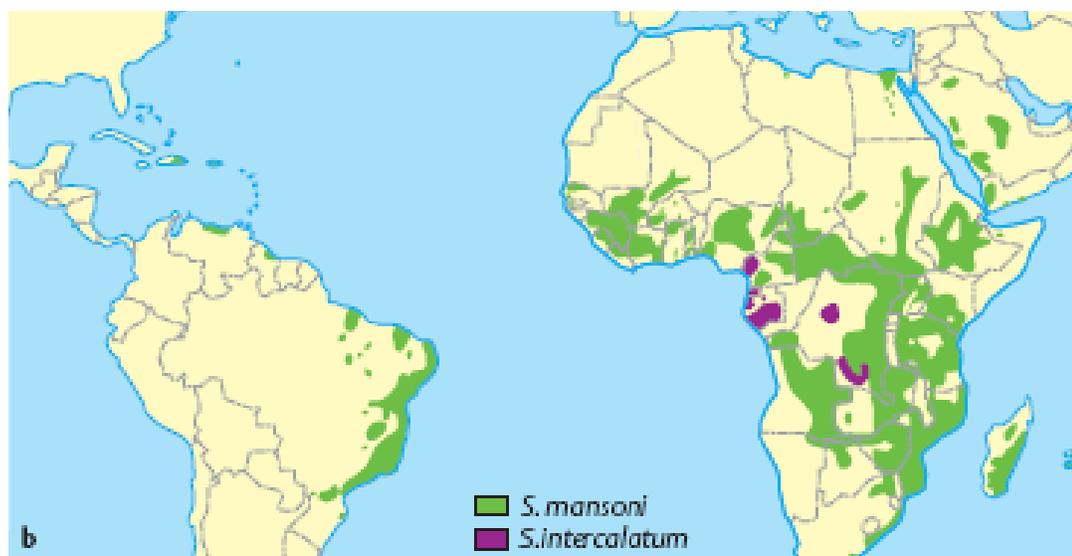


Figura 3- Distribuição geográfica da *S. mansoni* e *S. intercalatum* (Kayser, 2005).

1.1.5 - DIAGNÓSTICO

Os quadros clínicos da doença podem sugerir o diagnóstico da esquistossomíase mansônica, principalmente se o paciente vive ou procede de uma zona endêmica, ou se refere ter estado em contato com águas de um foco de transmissão conhecido. Porém dada a inespecificidade e inconstância dos sinais e sintomas da doença, somente provas laboratoriais e métodos de imagem podem fornecer elementos seguros para o diagnóstico. Os métodos de imagem, tal como a ultrasonografia e atualmente a ressonância magnética, de uso restrito a avaliação

clínica de pacientes e de grande importância no atendimento hospitalar, não constituem interesse específico deste projeto. Quanto aos exames laboratoriais, destacam-se três modalidades: 1) demonstração da presença de ovos do parasito e 2) realização de provas imunológicas (Rey, 2001) e 3) atualmente a detecção do DNA do parasito por métodos moleculares.

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Os métodos parasitológicos promovem a demonstração dos ovos do parasito nas fezes e entre eles o método de Kato-Katz (KK) é atualmente o mais utilizado em serviços de saúde. O método utiliza fezes frescas e tem por fundamento a clarificação da amostra fecal por uma mistura de glicerina e água, contra-corada com verde de malaquita (Katz *et al*, 1972). Além do KK, podemos citar o método de Lutz, também denominado método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) que consiste da sedimentação espontânea do material fecal diluído em água, para concentrar ovos de helmintos (Hoffman *et al*, 1934). Outra modalidade de diagnóstico parasitológico é a eclosão de miracídios, onde o diagnóstico é realizado pela visualização dos miracídios liberados dos ovos presente nas fezes, quando estes são diluídos em água com a menor salinidade possível e expostos à luz (Zicker *et al*, 1977).

A detecção dos ovos no material fecal é o método de diagnóstico tradicional e ainda é largamente utilizado em todo o mundo para o diagnóstico da infecção pelo *S. mansoni*, com a confirmação da espécie feita pela morfologia do ovo. Este é o meio mais direto e específico pela qual a presença da infecção pode ser estabelecida. O diagnóstico parasitológico tem a vantagem de possuir alta especificidade, devido à morfologia única dos ovos, que apresenta o espinho lateral, e de não necessitar de

equipamentos sofisticados. Porém, em muitos casos, os métodos de diagnóstico parasitológicos têm baixa sensibilidade e podem apresentar uma contagem de ovos inexata (Doenhof *et al*, 2004). Dificuldades podem ser encontradas nesses casos, principalmente quando: no período pré-patente da infecção, o qual dura em geral de 4 a 6 semanas; nas infecções unissexuais, quando não haverá oviposição; na ausência de eliminação dos ovos logo após medicação, quando esta for insuficiente para a cura, mas efetiva para provocar a suspensão da oviposição pelas fêmeas, temporariamente intoxicadas e atrofiadas (durante um ou mais meses) e na escassez ou inconstância da eliminação de ovos, nas infecções leves ou casos antigos (Rey, 2001). Além disto, a distribuição heterogênea dos ovos no material fecal de pacientes infectados tem grande influência nas dificuldades encontradas nos métodos parasitológicos baseados no encontro de ovos nas fezes (Woodstock *et al*, 1971; Martin *et al*, 1965).

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

O ovo, a cercária, o esquistossômulo e os vermes adultos produzem numerosas substâncias antigênicas que se difundem no meio, ou que são liberadas quando os parasitos morrem, levando o organismo do hospedeiro a produzir variados anticorpos. Os métodos imunológicos indiretos detectam a presença de algum desses anticorpos específicos, e assim estabelecem a suspeita de infecção por *S. mansoni*. Os resultados das provas imunológicas podem permanecer positivos por muito tempo, mesmo após o tratamento da infecção, não servindo, portanto, como diagnóstico definitivo da infecção ativa (Rey, 2001).

Os métodos imunológicos incluem: intradermo-reação, fixação do complemento, imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, radioimunoensaio, vários testes de floculação e precipitação e o teste de ELISA, que atualmente é o mais utilizado (Doenhoff *et al*, 2004), especialmente na avaliação de viajantes oriundo de áreas endêmicas (Libman, 1993). Vários destes métodos, como a intradermo-reação, fixação de complemento e o radioimunoensaio não são mais utilizados (Coura, 2005)

A BUSCA DE APRIMORAMENTO NOS MÉTODOS DIAGNÓSTICO

A baixa sensibilidade é um problema comum, principalmente para os métodos parasitológicos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a ausência de sensibilidade dos métodos de diagnóstico, é citado como uma das principais causas da dificuldade encontrada para o controle da esquistossomíase, devido à dificuldade de diagnosticar indivíduos com baixa intensidade de infecção (WHO, 2009). Por isso, diversos trabalhos vêm sendo feitos na busca de uma metodologia mais sensível. Entre os métodos parasitológicos podemos citar a técnica de concentração de ovos baseada em gradiente de densidade em coluna de Percoll (Eberl *et al*, 2002). A técnica de eclosão de miracídios também foi alvo de melhorias, com o desenvolvimento de dispositivo, na qual tem o objetivo de promover a remoção de detritos fecais e contém um recipiente específico para detecção dos miracídios, visando melhorar o desempenho da técnica (Jurberg *et al*, 2008). Na tentativa de melhorar a sensibilidade no diagnóstico parasitológico, outro dispositivo foi desenvolvido, porém desta vez para a aplicação de um gradiente salínico, visando facilitar o encontro dos ovos de *S. mansoni* nas fezes (Coelho *et al*, 2009). E por último, podemos citar a técnica FLOTAC,

baseada na flutuação de elementos parasitários após centrifugação, e um aparato que permite a leitura copromicroscópica (Glinz *et al*, 2010). Entre os métodos imunológicos destacam-se, a detecção de antígenos circulantes, antígeno catódico circulante (CCA) e antígeno anódico circulante (CAA) pelo ELISA (Van Lieshout *et al*, 2000). Para a detecção de anticorpos anti-*Schistosoma*, muitas preparações antigênicas foram produzidas a partir dos diferentes estágios evolutivos do helminto. Entre eles destacam-se o imunoensaio contendo como antígeno a fosfatase alcalina purificada de vermes (APIA) (Alarcón de Noya *et al*, 1997); detecção de anticorpos IgM seja por teste de imunofluorescência ou por ELISA, contra antígenos do intestino de verme adulto (Kanamura *et al*, 2002; Edward *et al*, 2005). Estudos de imunoeletrortransferência (Western-blot = WB) para o diagnóstico da esquistossomíase vêm sendo uma nova alternativa inclusive com estudos para detectar a diferença entre fase aguda e crônica da doença (Valli *et al*, 1999). Além disso, podemos citar o desenvolvimento e avaliação de um kit de WB com tiras de antígeno bruto do parasito (Sulahian *et al*, 2005), e a detecção por imunoblot de componentes de membrana de vermes adultos de *S. mansoni* (Cesari *et al*, 2005), ambos mostrando serem úteis e com ótima sensibilidade para o sorodiagnóstico. Além destes supracitados, a produção de imunoensaio com o antígeno solúvel de ovo (SEA) tem sido amplamente empregado, apresentando ótima sensibilidade e especificidade, e de acordo com alguns estudos comparativos, apresenta melhor desempenho do que antígeno de verme adulto (Hamilton *et al*, 1998). Mais recentemente, foi desenvolvido uma nova opção de ELISA para a detecção de anticorpos anti-*Schistosoma*, desta vez utilizando como antígeno cercárias de *S. mansoni*. Apesar de o ensaio apresentar sensibilidade e especificidade equivalente ao ELISA de antígeno solúvel de ovos (SEA), o autor defende a idéia de que antígeno cercariano é mais fácil de produzir do que antígeno solúvel de ovos (Chand *et al*, 2010).

Segundo alguns autores, os métodos imunológicos podem solucionar a problemática da baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos, principalmente em áreas de baixa prevalência de infecção. No entanto possuem desvantagens, principalmente a dificuldade de demonstrar a presença da infecção ativa, assim como a intensidade da infecção (Doenhoff *et al*, 2004).

DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação de sequências específicas de DNA alvo, mediada pela enzima *Taq* DNA polimerase, e por um par de iniciadores, que deve ser complementar a sequência a ser amplificada. A técnica consiste de ciclos repetitivos de três etapas que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação e na presença dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e uma solução tampão contendo magnésio, que age como co-fator da reação enzimática. A primeira etapa é de desnaturação das fitas do DNA-alvo, seguida pela hibridização das sequências de iniciadores e finalizando com a extensão da região flanqueada pelos iniciadores.

Com o progresso da tecnologia, a PCR vêm evoluindo, e a reação que até então promovia a detecção de DNA alvo no ponto final da reação atualmente também pode detectar no momento em que a reação está ocorrendo, através da PCR em tempo real. Esta, por sua vez, mede a fluorescência emitida em cada ciclo da reação, o que corresponde à formação do produto amplificado. A reação divide-se em três fases: fase exponencial (onde o dobro do produto é acumulado em cada ciclo e a reação é precisa e específica, assumindo eficiência de 100%), fase linear (na qual os componentes da

reação estão sendo consumidos e a velocidade da reação diminui) e a fase de platô (onde todos os reagentes foram consumidos e a reação é finalizada) (Heid *et al*, 1996). A detecção da fluorescência é realizada durante a fase exponencial da reação, conferindo grande vantagem a reação em tempo real, ao contrário da técnica convencional que ocorre na fase final, o que além de aumentar o efeito de inibidores, também necessita de um passo adicional para visualização do DNA amplificado, podendo aumentar o risco de contaminação. (Bell *et al*, 2002). A combinação de excelente sensibilidade, especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de uso e rapidez, tem conferido a tecnologia em tempo real uma ótima alternativa de escolha.

A tecnologia em tempo real possui diferentes sistemas de detecção, no qual os principais são: 1) intercalante de DNA de fita dupla, onde o SYBR® Green é o mais utilizado, este sistema é bastante sensível, porém não específico, em virtude do corante fluorescente possuir afinidade de ligação a qualquer produto de DNA dupla-fita; 2) detecção de fita simples através de sondas, e o principal representante deste grupo é a sonda *Taqman*. Esta sonda consiste de um pequeno oligonucleotídeo, que contém um corante fluorescente na extremidade 5' e um inibidor na extremidade 3' (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa como luz ou calor), fenômeno conhecido como FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Para a emissão da fluorescência é necessário que a sonda seja complementar e se ligue a fita simples de DNA e durante a reação, a enzima *Taq* DNA polimerase irá clivar a sonda (atividade 5' nucleasase), e separar o corante fluorescente do inibidor, gerando a fluorescência (Bell *et al*, 2002; Espy *et al*, 2006).

A metodologia molecular baseada na reação em cadeia da polimerase vem se tornando uma alternativa de diagnóstico para diversos patógenos, isso deve-se principalmente, a sua alta sensibilidade, facilidade de uso, principalmente nos dias

atuais, e sua capacidade de analisar uma grande quantidade de amostras simultaneamente (Morgan *et al*, 1998). A técnica tem sido amplamente empregada no diagnóstico de muitas infecções parasitárias, em virtude das vantagens supracitadas, além da sua capacidade de diferenciação entre espécies do mesmo gênero. Desde década passada, encontramos trabalhos publicados sobre a PCR como método de diagnóstico para diversas parasitoses, como por exemplo, *Plasmodium spp.*, *Trypanosoma spp.*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica* (Morgan *et al*, 1998), *Haemonchus contortus*, *Toxocara canis*, *Dirofilaria spp.* (McKeand *et al*, 1998), *Angiostrongylus costaricensis* (Silva *et al*, 2003) e *Ascaris sp.* (Carlsgart *et al*, 2009). Além disso, alguns trabalhos baseiam-se na técnica da PCR em tempo real, como o diagnóstico de ovos nas fezes de *S. japonicum* (Lier *et al* 2006) e *Haemonchus contortus* (Harmon *et al*, 2007), e ainda temos exemplos de PCR multiplex para detecção simultânea de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium parvum*, três dos principais protozoários causadores de diarreia (Verweij *et al*, 2004), e até mesmo a disponibilidade de um kit comercial para detecção de malária (Espy *et al*, 2006).

O diagnóstico do *S. mansoni* pela técnica da PCR já foi relatado, e ao longo dos anos vêm sendo aprimorado, sempre na busca de metodologias mais sensíveis e específicas. Em 1997, foi descrito uma PCR para detecção do parasito em seu hospedeiro intermediário, a *Biomphalaria glabrata*, proporcionando benefícios, tais como o diagnóstico da infecção em caramujos no período pré-patente, diferenciação da infecção causada por outros trematódeos e detecção da infecção inclusive em caramujos mortos (Jannotti-Passos *et al*, 1997). Em 2006, uma versão multiplex da PCR permitiu fazer o diagnóstico de caramujos infectados por *S. mansoni*, assim como a identificação da espécie, permitindo a diferenciação em *B. glabrata*, *B. tenagofila* e *B.*

straminea, auxiliando no entendimento da epidemiologia da doença (Jannotti-Passos *et al*, 2006 e Caldeira *et al* 2009).

Em 1991, Hamburguer identificou uma região altamente repetitiva, que constitui torno de 12% do genoma total de *S. mansoni* e possui tamanho de 121 pb. Este fragmento desde então vem sendo amplamente utilizado em metodologias moleculares. Em 1998, Hamburguer desenvolveu uma PCR para monitorar águas contaminadas com cercárias. Em 2002, foi descrito a primeira PCR para o diagnóstico de *S. mansoni* em amostras de fezes e soro humano (Pontes *et al*, 2002). Esta reação ao longo dos anos foi modificada, entretanto o fragmento amplificado foi sempre o mesmo. A primeira modificação feita foi o método de extração de DNA utilizado, que ao invés de um método caseiro (Método ROSE Modificado), a reação foi padronizada com um kit de extração comercial, o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Gomes *et al*, 2009), e em 2010 foi publicado o ELISA-PCR, onde o ELISA substitui a visualização em gel de eletroforese, visando aumentar a sensibilidade do método (Gomes *et al*, 2010). Recentemente o mesmo fragmento de 121 pb foi alvo de amplificação do DNA do parasito em dois trabalhos: 1) em amostras de urina, infectadas artificialmente com DNA *S. mansoni*, e a detecção baseada na PCR convencional (Enk *et al*, 2010); 2) e em amostras de plasma, testadas experimentalmente em camundongos infectados e em soro de pacientes infectados com *Schistosoma spp.*, detectados através da reação em tempo real (Wichmann *et al* 2009). Ambas as metodologias baseiam-se na detecção de DNA circulante livre de célula. A detecção de DNA na urina já havia sido relatada, em estudos com camundongos e amostra de pacientes, porém o fragmento alvo amplificado faz parte da subunidade 28S do *S. mansoni*, que segundo o autor é capaz de diferenciar entre as principais espécies de *Schistosoma spp.* (Sandoval *et al*, 2006 a e b). O fragmento de Hamburguer, 1991 não é espécie específico, podendo amplificar

DNA de outras espécies, conforme visto no trabalho de Wichmann, 2009, em que amostras de *S. haematobium* e *S. japonicum* foram também detectadas.

Além de Wichmann, a tecnologia da PCR em tempo real também foi descrita para diagnóstico de *S. mansoni* por duas reações distintas: 1) uma delas é baseada na tecnologia *SYBR Green*, e amplifica uma pequena subunidade de RNA ribossomal (SSU rRNA), no entanto esta reação foi padronizada com amostras de DNA de verme adulto, e não foi testada com nenhuma amostra que pudesse ser realizado diagnóstico clínico (Gomes et al, 2006); 2) a outra reação é baseada na tecnologia *Taqman*, e consiste de um multiplex para detecção simultânea entre *S. mansoni* e *S. haematobium* (Hove et al, 2008). Nessa reação o fragmento alvo é o gene Cox 1 (citocromo oxidase subunidade 1), que compõem parte da região codificante do DNA mitocondrial de *Schistosoma spp.* (Le et al, 2000 b). A reação foi testada em amostras de fezes de pacientes infectados com carga parasitária variando de alta a muito baixa. Além disso, chamou atenção a diversidade de amostras utilizadas para testar a especificidade da reação (DNA de 7 helmintos, 8 protozoários, 15 bactérias e fungos, 80 amostras de fezes positivas na microscopia e no PCR para *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba díspar* e *Crisptosporidium parvum* e 40 amostras de fezes negativas através de microscopia). Além de Hove, 2008 uma PCR multiplex convencional publicada recentemente, amplifica o gene da Cox 1, promovendo a diferenciação entre 4 principais espécies de *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Kato-Hayashi et al, 2010).

Com o advento do projeto genoma do *S. mansoni*, perspectivas de um melhor entendimento da biologia do parasito, de sua interação com o hospedeiro, e principalmente da identificação de novos alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos, vacinas e técnicas de diagnóstico têm sido implementadas. O projeto

foi estabelecido pela Organização Mundial da Saúde, em 1994, e o seu sequenciamento foi realizado no *The Institute for Genomic Research* (TIGR) nos Estados Unidos e no *Wellcome Trust Sanger Institute* na Inglaterra (Han *et al*, 2009), com a publicação do seu genoma em 2009 (Berriman *et al*, 2009). De acordo com as investigações na área genômica, sabe-se que o DNA mitocondrial de *Schistosoma spp.* possui uma região não codificante de tamanho variável, ocorrendo variações inclusive dentro da mesma espécie, e uma região codificante bem conservada, onde se encontra o gene da Cox 1. Além disso, o arrançamento gênico dentro da região codificante do DNA mitocondrial apresenta fortes divergências entre espécies de *Schistosoma spp.*, principalmente entre a asiática e africana (Le *et al*, 2000 a; Le *et al*, 2000 b; Lo Verde *et al*, 2004). Ainda sabe-se que o arrançamento gênico das espécies asiáticas, como por exemplo o *S. japonicum*, apresentam muita semelhança com outros trematódeos e cestódeos, que por sua vez diferem das espécies africanas, conferindo por sua vez especificidade gênica às espécies africanas, como o *S. mansoni*. Portanto genes do DNA mitocondrial podem ser alvos úteis ao diagnóstico molecular, em virtude de sua conservação, e no caso do *S. mansoni*, uma espécie africana, pela especificidade.

1.2 – JUSTIFICATIVAS

As idéias iniciais que resultaram neste projeto vieram de alguns estudos, destacando-se a tentativa de uso de um gradiente de concentração de ovos em coluna de Percoll (Eberl *et al* 2002), PCR nas fezes e o uso dos sistemas de isolamento com microesferas magnéticas, tal como a detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* (Pereira *et al*, 1999). Este último método vinha sendo empregado em larga escala no

Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS como parte das atividades de um projeto de estudo da transmissão hídrica de protozoários.

A definição do grau de endemicidade baseia-se na intensidade de infecção que, por sua vez, é estimada pela média do número de ovos de *S. mansoni* eliminados pelos indivíduos parasitados. Segundo a Organização Mundial da Saúde, áreas de baixa endemicidade são caracterizadas por apresentar pacientes com carga parasitária menor do que 100 ovos por grama de fezes, e nesta situação os métodos de diagnóstico parasitológico não apresentam uma sensibilidade adequada (WHO, 2009).

Conforme mencionado acima, o comportamento epidemiológico da esquistossomíase mansônica em áreas de baixa endemicidade é característico por apresentar baixas prevalências e cargas parasitárias. Isso ocorre no município de Esteio e mais recentemente no município de Porto Alegre (dados não publicados), uma vez que os casos confirmados mostraram claramente que a maioria dos pacientes infectados apresentaram menos de 1 ovo por grama de fezes (opg) (Graeff-Teixeira *et al*, 2004). Portanto, o objetivo do presente estudo é buscar uma nova metodologia, com uma maior sensibilidade, capaz de detectar cargas parasitárias extremamente baixas. Em um primeiro momento, a busca será por um diagnóstico parasitológico, devido à alta especificidade encontrada nesses métodos (Doenhoff *et al*, 2004), onde o sistema de detecção é a visualização do ovo do *S. mansoni*. Além disso, o interesse nos métodos parasitológicos de diagnóstico é dirigido pela convicção da necessidade de um método “padrão ouro” extremamente sensível, inclusive para a padronização adequada de métodos moleculares, tal como a PCR para detecção de ácidos nucleicos no soro ou nas fezes, assim como na avaliação de métodos indiretos, como os métodos sorológicos. O presente estudo também se justifica para fazer a associação de métodos parasitológicos com métodos moleculares, onde, em um segundo momento, a

finalidade será obter uma metodologia mais rápida e menos trabalhosa em casos de análise de um grande número de amostras. Para realização da segunda parte deste trabalho, escolhemos uma metodologia molecular baseada na PCR em tempo real, já padronizada por Hove, 2008. A escolha desta reação justifica-se pela especificidade do alvo a ser amplificado, gene Cox 1, conforme mencionado anteriormente, e como apresentado pelo autor. Além disso, em virtude de sua sensibilidade, onde a partir de 100 ovos por grama de fezes, o autor obteve 100% de sensibilidade. Portanto como esse trabalho desde o início justificou-se pelo diagnóstico de baixas cargas parasitárias, a idéia foi testar esta reação em situações com número menor do que 100 opg.

Foram realizados vários experimentos sempre visando buscar a otimização de métodos de diagnóstico. A partir dos resultados obtidos, apresentados ao longo do trabalho, conseguimos obter um método parasitológico no qual tem sensibilidade de 100% a partir de 1.34 opg. Por isso, este método foi submetido ao pedido de patente nacional, e denominado de Helmintex.

1.3 - OBJETIVO

1.3.1 - OBJETIVO GERAL

Otimizar os métodos de diagnóstico da esquistossomíase mansônica, para uso em áreas de carga parasitária extremamente baixa.

1.3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Testar a separação por densidade, de ovos de *S. mansoni* das fezes, através de colunas de sacarose.
- 2- Produzir anticorpos anti-superfície de ovo de *S. mansoni* e testá-los em técnica de imunoseparação com microesferas magnéticas.
- 3- Testar o isolamento, com emprego de partículas paramagnéticas, de ovos de *S. mansoni* utilizando lectinas como ligante na reação.
- 4- Padronizar o método Helmintex para detecção de baixas cargas parasitárias.
- 5- Avaliar o rendimento do processo de extração de DNA de ovos de *S. mansoni*.
- 6- Avaliar o desempenho da reação da polimerase em cadeia (PCR) como alternativa para a visualização dos ovos de *S. mansoni* após a concentração pelo método Helmintex.

CAPÍTULO 2

2.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 – Parasito

O isolado de *S. mansoni* obtido do foco de transmissão em Esteio tem sido mantido em laboratório por meio de passagens em *Biomphalaria* sp. e camundongos *Swiss*. Os moluscos criados em laboratório para manutenção do ciclo são infectados com miracídeos provenientes de ovos do parasito liberados pelas fezes e, após algumas semanas, são expostos à luz artificial por no mínimo 2 h para liberação de cercárias. As cercárias coletadas são usadas para infectar camundongos *Swiss*. Um lote de camundongos é utilizado para manutenção do ciclo e outro, após 45 dias, é sacrificado. Dos camundongos que foram sacrificados, o fígado foi retirado e feita digestão para obtenção de ovos.

2.1.2 - Digestão de fígado de camundongos infectados

Para obtenção de ovos de *S. mansoni* foi feita a digestão de fígado de camundongos infectados, através do tratamento do órgão em solução de hidróxido de potássio 4 %, colocado em banho-maria por 2 h a 46 °C. Logo depois centrifugado por 3 minutos a 600 x **g**. Ao sedimento foi acrescentada 1 mL de solução salina e retiradas três alíquotas de 10 µL para ser feita estimativa do número total de ovos (Martinez *et al*, 2003). Os ovos resultantes foram utilizados para realização de diferentes experimentos ao longo do trabalho.

2.1.3 - Concentração de ovos de *S. mansoni* através de coluna de sacarose

Conjuntos de cinco ovos de *S. mansoni*, resultantes da digestão de fígado de camundongos infectados, foram separados e misturados a 100 µL de sedimento de fezes humanas não infectadas. Esta suspensão foi colocada em tubos de 15 mL, contendo em cada tubo 5 mL de sacarose em diferentes molaridades: 5, 4, 3, 2, 1. Os tubos foram centrifugados a 300 x g, por 30 min a 21 °C. Foi realizada pesquisa do sedimento e da camada aquosa acima da sacarose em busca dos ovos.

2.1.4 - Imunização dos coelhos

Ovos resultantes da digestão de fígado foram utilizados para imunização de coelhos, com o objetivo de obter anticorpos anti-superfície do ovo de *S. mansoni*. Dois grupos de coelhos foram utilizados. O primeiro grupo, contém quatro coelhos (1 a 4), e em cada um deles, foi administrado diferentes volumes de uma suspensão contendo aproximadamente 5.000 ovos inteiros em solução salina: 50 µL, 100 µL, 200 µL, 400 µL. O segundo grupo era constituído de dois coelhos (5 e 6), e para este grupo, aproximadamente 90.000 ovos foram tratados com 3 séries de congelamento/descongelamento, seguido de sonicação (Vibracell, 70 Watts, Connecticut, USA) com quatro ciclos de 2 min à amplitude de 30 %. Após este tratamento são obtidos ovos particulados que irão servir de imunizantes para os dois coelhos nas seguintes quantidades 100 µL e 200 µL.

A primeira imunização, em todos os casos, foi feita com uma emulsão, preparada por meio da mistura da suspensão de ovos e de adjuvante completo de Freund (Gibco,

EUA). A cada 15 dias, foi realizada uma nova imunização, onde foi utilizado adjuvante incompleto de Freund (Gibco, EUA), até obtenção de reatividade satisfatória.

2.1.5 - Imunofluorescência Indireta para titulação de anticorpos anti-superfície de ovo de *S. mansoni*

Após 21 dias de cada imunização, foi coletado sangue dos coelhos imunizados e de um coelho não imunizado, utilizado como controle negativo, para realização do ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) verificando a produção dos anticorpos. O ensaio foi feito com conjuntos de 20 ovos de *S. mansoni*, um conjunto incubado a 37°C em câmara úmida por 90 min com soro de coelho não imunizado, e os outros conjuntos com soro de cada um dos coelhos imunizados sob as mesmas condições. Após incubação, foram lavados com PBS e novamente incubados, agora com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Zymed, San Francisco, USA) também a 37°C em câmara úmida, por 90 min. Logo após, os ovos foram analisados através de microscopia de fluorescência.

2.1.6 - Separação Imuno-magnética dos ovos de *S. mansoni*

Foram utilizadas microesferas magnéticas Dynal Biotech acopladas a anticorpos anti-IgG de coelho, para a separação imuno-magnética dos ovos de *S. mansoni*, segundo um protocolo preliminar.

Inicialmente, uma alíquota de 22 µL das microesferas foram separadas para o experimento, onde se encontra uma quantidade de aproximadamente $6,7 \times 10^8$ microesferas/mL. Isto de acordo com as instruções do fabricante é uma quantidade

seguramente suficiente. Antes de sua utilização no experimento, as microesferas devem ser lavadas com PBS, para retirar preservantes (azida sódica) e surfactantes, evitando qualquer interferência durante o processo. Conjuntos de 25 ovos de *S. mansoni* foram separados e um deles incubado com soro de coelho não imunizado e os outros incubados com soro de cada um dos coelhos imunizados. A incubação foi realizada em câmara úmida por 1 h a 37°C. Após a incubação os ovos foram lavados com PBS e transferidos para um microtubo contendo microesferas. Logo a seguir, incubados novamente por 1 h em agitação rotatória. Após, os microtubos foram colocados no magneto (Dynal Biotech) por 3 min e o sobrenadante foi retirado e separado em outro microtubo, sendo centrifugado por 2 min a 12 800 x **g**, a temperatura ambiente. O sedimento que fica acoplado ao magneto foi ressuspenso e analisado em microscopia óptica, assim como o sobrenadante.

2.1.7 - Separação magnética dos ovos de *S. mansoni* utilizando lectinas como ligante na reação

Cinco lectinas biotiniladas, selecionadas a partir de uma revisão na literatura sobre a composição de carboidratos da superfície do ovo de *S. mansoni* e respectivas lectinas ligantes serão utilizadas na reação de separação magnética dos ovos (Beisler *et al* 1984; Colditz *et al* 2002; Robjin *et al* 2005). As lectinas e os respectivos carboidratos-alvo são: *Triticum vulgare* ((glc NAc)₂NeuNAc) (Sigma), *Ulex europeus* (α -L-fucose) (Sigma), *Arachis hypogaea* (β -gal(1>3)galNAc) (Sigma), *Lycopersicon esculentum* (glcNAc)₃ (Sigma), *Concavalin A* (α -man, α -glc) (Sigma).

Todas as lectinas foram dissolvidas em 1 mL de tampão para lectina com a seguinte composição: 6,057g de TRIS, 8,7g NaCl, 0,203g MgCl₂ e 0,111g CaCl₂, em pH 7,6 e acrescentado azida sódica 0,02 % (Rhodes, 1998). Todas em uma concentração de 1mg/mL.

2.1.7.1- Titulação e avaliação de eficácia de ligação das lectinas ao ovo de *S. mansoni*

As cinco lectinas biotiniladas foram diluídas nas seguintes concentrações: 5, 10 e 20 µL/mL. Após separar conjuntos de 100 ovos de *S. mansoni* em microtubo contendo 100 µL de solução salina, cada conjunto foi incubado com 50 µL de cada uma das cinco lectinas e em cada uma das concentrações citadas anteriormente. A incubação foi de 1 h a temperatura ambiente. A seguir os ovos foram lavados com PBS e novamente incubados por 1 h a temperatura ambiente em agitador orbital, com 5 µL de partículas paramagnéticas que contém em sua superfície estreptavidina (Bangs Lab, EUA). Após os ovos foram observados ao microscópio para verificar a quantidade de partículas que ficaram ligadas na superfície do ovo. Outro experimento foi realizado, inicialmente como citado acima, porém ao invés dos ovos serem analisados no microscópio, estes foram levados ao magneto, onde o sobrenadante foi retirado e separado, o sedimento ressuspendido em PBS, e após, os dois analisados ao microscópio para estimativa do número de ovos em cada um.

2.1.8 –Processo de concentração de ovos nas fezes em múltiplas etapas e isolamento dos ovos por interação com partículas paramagnéticas

Em 30 g de fezes foram semeados 10 ovos de *S. mansoni*. As fezes foram diluídas em água e filtradas em gaze em um copo cônico. O sobrenadante resultante da sedimentação espontânea das fezes foi retirado, acrescentando água novamente. Este procedimento foi repetido a cada 1 h, até que o sobrenadante ficasse limpo e claro. O sedimento resultante foi passado por um conjunto de 3 peneiras metálicas, de 100, 200 e 325 malhas por polegada. O material retido na última peneira foi submetido ao método de Ritchie (Ritchie, 1948), onde o material acrescido de acetato de etila 1:2 foi centrifugado por 3 min a 300 x **g** em tubo de 15 mL. O restante do sedimento foi transferido para um microtubo onde foi adicionado 20 µL de partículas paramagnéticas e 1 mL de lectina. Como controle negativo, foi incluída uma preparação contendo apenas partículas paramagnéticas. O material foi incubado por 30 min em agitador orbital e após submetido ao magneto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido e analisado no microscópio em busca dos ovos de *S. mansoni*.

Após o estabelecimento das condições mais adequadas para isolamento de ovos, foram realizadas avaliações de eficácia do método (sensibilidade), fazendo-se repetidos experimentos de semeadura em 30 g de fezes normais, com variadas quantidades de ovos: 3, 7, 10, 20, 30, 40 e 60.

2.2 – RESULTADOS

2.2.1- Separação dos ovos de *S. mansoni* por coluna de sacarose

Os experimentos com diferentes concentrações de sacarose como meio de filtração dos ovos de *S. mansoni* e retenção de material particulado mais leve que o ovo (Figura 4), resultaram em desempenhos insatisfatórios tendo em vista o seguinte: 1) a preparação menos densa (1M) permitia boa recuperação de ovos, porém o sedimento ficava muito sujo b) a preparação mais densa (5M) produzia sedimento limpo, porém com reduzida recuperação dos ovos, além da dificuldade extrema de preparação pela sua alta viscosidade.

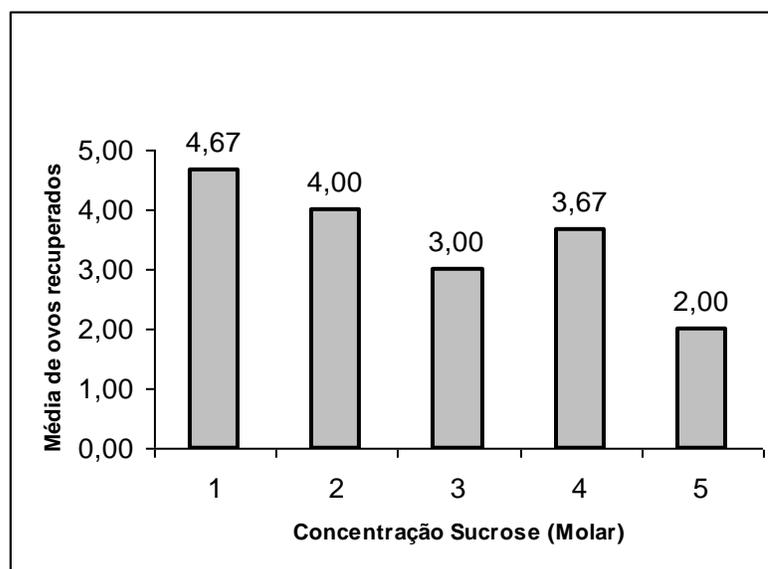


Figura 4 – Desempenho de colunas de sacarose de diferentes densidades (de 1M até 5M) permitindo a passagem de ovos de *S. mansoni*. Em cada experimento feito em triplicata, foram semeados 5 ovos, com a recuperação média de ovos indicada pelas colunas e seus rótulos.

2.2.2- Imunização dos coelhos e separação imunomagnética dos ovos de *S. mansoni*

Quando foram utilizados ovos inteiros como imunizante (coelhos 1 a 4), não se obteve um soro fortemente reativo. Apenas o coelho 4 apresentou discreta reatividade evidenciada na imunofluorescência indireta (IFI). Com este soro foram realizados experimentos, com resultados mostrados na Tabela 1. A escolha, a princípio, do número de 25 ovos (experimento 1) foi devido à dificuldade de obter ovos em grande quantidade. Como inicialmente se observou uma perda grande de ovos, provavelmente durante as lavagens, ensaiou-se aumentar o seu número sempre que possível (experimentos 2 e 3). Foi observado que o número de ovos no sedimento, e portanto, carregado junto com as microesferas, era maior inclusive nas preparações tratadas somente com PBS e microesferas. No experimento 3, além do PBS e microesferas, o soro negativo também apresentou maior número de ovos no sedimento.

Com o emprego da suspensão particulada de ovos, o coelho 5 apresentou fraca reatividade (Figura 5 e 6) e este soro (COE 5) passou a ser utilizado nos experimentos seguintes representados na Tabela 2. Pode se observar que o uso do COE 5 produz uma maior retenção de ovos no sedimento, tanto com o emprego de 22 ou 5 μ L da suspensão de microesferas. A redução do volume de microesferas para 3 μ L não produziu resultado satisfatório, já que a maioria dos ovos ficou no sobrenadante. É interessante que no experimento 1, ocorre pela primeira vez a indicação de que as microesferas por si só parecem ser capazes de promover a separação dos ovos ou co-migração para o sedimento por ação do magneto, já que nenhum ovo foi encontrado no sobrenadante e 15 dentre o total de 25 ovos estavam no sedimento. Este resultado não

foi repetido nos experimentos 2 e 3. No experimento 3, a falta de migração dos ovos para o sedimento pode ter sido decorrência de volume insuficiente das microesferas.

Um fator limitante importante para a utilização de soros policlonais é a variabilidade na resposta de cada animal imunizado, o que prejudica a reprodutibilidade de testes onde estes anticorpos sejam elementos de ligação entre as microesferas e os ovos.



Figura 5- IFI empregando soro Coelho Nº 5, Imunizado com antígeno particulado de ovo.



Figura 6- IFI empregando soro Coelho Negativo como anticorpo primário

Tabela 1 - Experimentos de separação imuno-magnética de ovos de *S. mansoni*, empregando soro do coelho imunizado número 4

| | Soro Coelho Positivo | Soro Coelho Negativo | PBS e microesferas |
|----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Experimento 1 | | | |
| Sobrenadante | 5 | 0 | Nr |
| Sedimento | 17 | 6 | Nr |
| Total de ovos | 25 | 25 | Nr |
| Experimento 2 | | | |
| Sobrenadante | 0 | 0 | 2 |
| Sedimento | 33 | 12 | 30 |
| Total de ovos | 35 | 35 | 35 |
| Experimento 3 | | | |
| Sobrenadante | 6 | 17 | 33 |
| Sedimento | 24 | 36 | 40 |
| Total de ovos | 100 | 100 | 100 |

Nr: não realizado

Tabela 2 – Experimentos de separação imuno-magnética de ovos de *Schistosoma mansoni*, empregando soro do coelho imunizado número 5

| | Soro Coelho Positivo | Soro Coelho Negativo | PBS e Microesferas |
|--|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Experimento 1 com 22 µL de microesferas | | | |
| Sobrenadante | 5 | 0 | Nr |
| Sedimento (esferas) | 11 | 15 | Nr |
| Total de ovos | 25 | 25 | Nr |
| Experimento 2 com 5 µL de microesferas | | | |
| Sobrenadante | 8 | 20 | 18 |
| Sedimento (esferas) | 17 | 5 | 7 |
| Total de ovos | 25 | 25 | 25 |
| Experimento 3 com 3 µL de microesferas | | | |
| Sobrenadante | 5 | 11 | 1 |
| Sedimento (esferas) | 1 | 7 | 2 |
| Total de ovos | 25 | 25 | 25 |

Nr: não realizado

2.3- Artigo Científico:

DETECTION OF *SCHISTOSOMA MANSONI* EGGS IN FECES THROUGH THEIR INTERACTION WITH PARAMAGNETIC BEADS IN A MAGNETIC FIELD

Candida Fagundes Teixeira, Erli Neuhauss, Renata Ben, Juliano Romanzini, Carlos Graeff-Teixeira

Este artigo apresenta os resultados relativos aos objetivos específicos 3 e 4:

- 3- Testar o isolamento, com emprego de partículas paramagnéticas, de ovos de *S. mansoni* utilizando lectinas como ligante na reação.
- 4- Padronizar o método Helmintex para detecção de baixas cargas parasitárias

Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field

Candida Fagundes Teixeira, Erli Neuhaus, Renata Ben, Juliano Romanzini, Carlos Graeff-Teixeira*

Laboratórios de Parasitologia Molecular e de Biologia Parasitária, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Abstract

Background: Diagnosis of intestinal schistosomiasis in low endemic areas is a problem because often control measures have reduced egg burdens in feces to below the detection limits of classical coproparasitological methods. Evaluation of molecular methods is hindered by the absence of an established standard with maximum sensitivity and specificity. One strategy to optimize method performance, where eggs are rare events, is to examine large amounts of feces. A novel diagnostic method for isolation of *Schistosoma mansoni* eggs in feces, and an initial evaluation of its performance is reported here.

Methodology/Principal Findings: Known amounts of *S. mansoni* eggs were seeded into 30 g of normal human feces and subjected to a sequence of spontaneous sedimentation, sieving, Ritchie method, incubation and isolation through interaction with paramagnetic beads. Preliminary tests demonstrated the efficacy of lectins as ligands, but they also indicated that the paramagnetic beads alone were sufficient to isolate the eggs under a magnetic field through an unknown mechanism. Eggs were identified by microscopic inspection, with a sensitivity of 100% at 1.3 eggs per gram of feces (egg). Sensitivity gradually decreased to 25% at a concentration of 0.1 egg. In a preliminary application of the new method to the investigation of a recently established focus in southern Brazil, approximately 3 times more eggs were detected than with the thick-smear Kato-Katz method.

Conclusions/Significance: The novel *S. mansoni* detection method may significantly improve diagnosis of infections with low burdens in areas of recent introduction of the parasite, areas under successful control of transmission, or in infected travelers. It may also improve the evaluation of new treatments and vaccines.

Citation: Teixeira CF, Neuhaus E, Ben R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C (2007) Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2): e73. doi:10.1371/journal.pntd.0000073

Editor: Jeffrey Bethony, George Washington University, United States of America

Received: February 6, 2007; **Accepted:** July 25, 2007; **Published:** November 14, 2007

Copyright: © 2007 Teixeira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Partial financial support was provided by PUCRS. C Graeff-Teixeira (307872/2004-1, PQ ID) and CF Teixeira (114325/03-0) are recipients of CNPq-Brazil fellowships and a CNPq-Brazil grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: C Graeff-Teixeira, CF Teixeira and E Neuhaus have a patent pending on Helmintex.

*E-mail: graeteix@gmail.com

Introduction

In areas with recent introduction of *Schistosoma mansoni* transmission or areas where control efforts have reduced parasitic burden, the classical parasitological methods for finding eggs in stools do not demonstrate sufficient sensitivity [1,2,3]. Travelers may have light *S. mansoni* infections of difficult definitive diagnosis [4]. Molecular diagnostic tools are an alternative detection method, but more extensive validation in areas of low endemicity is still lacking. Very sensitive egg detection systems are desirable as methods for definitive diagnosis and are the standard for evaluation of other indirect diagnostic methods, such as serological tests. Since *S. mansoni* eggs are large and have a peculiar shape and a lateral spine, they are easily recognized visually, using a microscope, leading to a definitive diagnosis with few possibilities of false-negative results. Increased amounts and/or numbers of fecal samples, the use of differential fecal concentration methods or even application of mathematical modeling have been tested in order to improve sensitivity of parasitological diagnosis, but none of these approaches have been convincing enough to warrant extensive field trials [5,6].

Paramagnetic beads coupled to a variety of ligands are available for different applications such as purification of whole cells, organelles, nucleic acids, proteins and other molecules [7,8], and may be used for *S. mansoni* antigen detection [9]. Magnetic separation has also been applied for parasitological diagnosis, for example, in detection of cryptosporidiosis and giardiasis [10]. Here we report the preliminary evaluation of a highly sensitive method for isolation and detection of *S. mansoni* eggs from large amounts of feces which is based on their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field.

Materials and Methods

Laboratory samples of *Schistosoma mansoni* were maintained by passages through Swiss albino mice and *Biomphalaria glabrata*. Both parasite and molluscs came from a local "Esteio" strain (Rio Grande do Sul, Brazil). Eggs were recovered by artificial digestion of livers, from experimentally infected rodents, in 4% KOH for 2 h at 46°C.

Author Summary

Schistosomiasis mansoni is a parasitic infection that affects approximately 200 million people, mainly in the tropics. The worms live inside the veins of intestines and liver and produce eggs that are eliminated within feces. If the eggs reach water, a ciliated larva is released and enters snails to develop into a larva infective to man and other vertebrates. Most infections evolve without overt disease, but severe intestinal, hepatic, pulmonary and cerebro-medullary dysfunctions may occur after many years. Definitive diagnosis is made through the identification of eggs in stool. Classical diagnostic methods fail to detect infection when the number of eggs is low (e.g., in areas where control measures have decreased the intensity of infection or in the case of light infections in travelers who have had only brief exposure). A new and very sensitive method is reported here, in which eggs are isolated from large amounts of feces through their interaction with magnetic beads. After incubation with the fecal sediment, eggs co-migrate with the beads towards a magnet attached to the test tube. This improvement in diagnostic methodology will strengthen efforts to control schistosomiasis.

Experiments with lectins as ligands

Stock solutions (1 mg/mL) of five biotinylated lectins were prepared with a pH 7.6 "lectin buffer" (6.057 g TRIS, 8.7 g NaCl, 0.203 g MgCl₂, 0.111 g CaCl₂ and 0.02% sodium azide, per Litre) [11]. The five lectins (SIGMA, USA), reported in the literature as ligands to the surface of *S. mansoni* eggs [12,13,14], were: *Triticum vulgaris* (L5142), Concanavalin A (C2272), *Ulex europaeus* (L8262), *Arachis hypogaea* (L6135), and *Lycopersicon esculentum* (L0651). Microtubes containing 100 eggs in 100 µL PBS plus 50 µL of lectins at several concentrations (5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL) were incubated at room temperature for 1 h. After a washing step with PBS, the volume was adjusted to 1.5 mL and paramagnetic beads covered with streptavidin (Bangs Labs, USA) were added to a final concentration of 1.4% (v/v). Incubation was performed in an orbital shaker, at room temperature, for 1 h. Eggs and beads, without lectins, were incubated as a negative control. The microtubes containing the preparations were connected to a magnet (Dynal, Oslo, Norway) for 3 min, supernatants were removed, and the sediments retained at the wall were collected and examined under a microscope for counting of *S. mansoni* eggs. Several combinations of lectins were also tested under the same conditions and at a final individual concentration of 40 µg/mL.

Experiment with different beads

Paramagnetic beads coupled with 1) anti-rabbit-IgG (Dynal, Oslo, Norway); 2) a monoclonal antibody anti-Cryptosporidium (Dynal, Oslo, Norway); 3) streptavidin (Bangs Lab, USA); 4) streptavidin followed by biotinylated lectin (SIGMA, USA), were incubated with eggs in distilled water, under the conditions described above. A preparation with eggs and without beads (negative control) and another with eggs and a latex (non-magnetic) bead coupled to Protein A (Dynal, Oslo, Norway) were also tested.

Seeding experiment in feces with and without lectins

Based on the results from the previous experiment, 10 *S. mansoni* eggs were seeded in 30 g of normal human feces. The fecal sample was suspended and stirred in 250 mL of water, filtered through 8 layers of surgical gauze into a conical cup, left for 1 h at RT, re-suspended in distilled water and the spontaneous sedimentation

repeated until a clear supernatant was obtained. Sediment was sieved through 100 (S1), 200 (S2) and 325 (S3) meshes per square inch metal sieves. The fraction retained at S3 was submitted to the method of Ritchie [15] and the procedure was repeated usually twice or as necessary to get a clear supernatant without a ring of debris. The final sediment was incubated either with or without 20 µg/mL of biotinylated *Triticum vulgaris* as previously described in the lectin experiments. Paramagnetic beads were coupled with streptavidin (Bangs Lab, USA).

Seeding experiment to evaluate sensitivity

Eggs were added at different concentrations (60, 40, 30, 20, 10, 7 and 3) per 30 g of normal human feces, corresponding respectively to 2.0, 1.3, 1.0, 0.6, 0.3, 0.2, 0.1 eggs per gram of feces (epg). The fecal samples were processed as described above, except that lectins were not employed and uncoated paramagnetic beads (BioMag, BM547/7065, Bangs Lab, USA) were used to isolate the eggs.

The novel method was employed for the first time in the investigation of two infected individuals from a potential new focus of transmission in Porto Alegre, the capital of Brazil's southernmost State. For each sample (whole evacuation) 2 thick fecal smears or Kato-Katz method [16] were prepared and 30 g of feces were processed with the new method. The method and kit, including the reagents, magnet and sieves, have been named Helmintex (patent pending).

Ethical oversight

The study protocol was approved by the ethics committee of the Public Health Central Laboratory of Rio Grande do Sul (LACEN/RS). The normal feces used in the seeding experiments were donated by three of the authors (C G-T, CFT, and JR). Informed consent was obtained from the two infected individuals who donated feces for the study.

Results

Table 1 shows the percentage of eggs found in the supernatant (SN) and in the pellet (SD) formed at the wall of the microtube in contact with the magnet. Both the negative control and the several preparations with lectins contained most of the eggs in the pellet. The results indicated that both negative control and several combinations of lectins were effective at promoting isolation of the eggs (Table 2). The data in Table 3 were used to compare treatments with different beads, and confirmed that lectins were not essential and that paramagnetic beads were necessary for isolation of the eggs, since latex beads and eggs alone did not migrate to the magnet. The results of the seeding experiment in feces with and without lectins (data not shown), besides confirming that lectins were not essential, demonstrated that isolation of eggs occurred in the presence of fecal sediment. Based on these initial results we decided to use uncoupled beads for future testing.

The recovery of seeded eggs in fecal samples is shown in Table 4. Sensitivity was 100% with egg burdens of 2 and 1.3 epg and gradually decreased to 20% as the egg burden was reduced to 0.1 epg. The investigation of the new focus in Porto Alegre revealed one infection (Patient A) out of 6 individuals of the family and the confirmation of infection in the index case (Patient B), with total numbers of eggs per sample as shown in Table 5.

Discussion

The Kato-Katz (KK) method is the cornerstone for parasitological diagnosis of *S. mansoni* infection. The KK method has the advantage of being a simple and inexpensive procedure, which has

Table 1. Percentage of *S. mansoni* eggs recovered in supernatant (SN) and pellet (SD) after seeding experiments with different concentrations of biotinylated lectins and paramagnetic beads covered with streptavidin.

| Lectins | SN or SD | 0 µg/mL | 5 µg/mL | 10 µg/mL | 20 µg/mL |
|--------------------------------|----------|---------|---------|----------|----------|
| <i>Triticum vulgare</i> | SN (%) | 44 | 17 | 10 | 0 |
| | SD (%) | 56 | 83 | 90 | 100 |
| <i>Concavalin A</i> | SN (%) | 1 | 3 | 3 | 15 |
| | SD (%) | 99 | 97 | 97 | 85 |
| <i>Ulex europeus</i> | SN (%) | 23 | 4 | 18 | 7 |
| | SD (%) | 77 | 96 | 82 | 93 |
| <i>Arachis hypogaea</i> | SN (%) | 0 | 5 | 4 | 7 |
| | SD (%) | 100 | 95 | 96 | 93 |
| <i>Lycopersicum esculentum</i> | SN (%) | 5 | 3 | 14 | 3 |
| | SD (%) | 95 | 97 | 86 | 97 |

doi:10.1371/journal.pntd.0000073.t001

justified its widespread use in the classical endemic areas of intestinal schistosomiasis [17]. Several efforts have been made to develop more sensitive diagnostic tools, such as immunoassays for detection of *S. mansoni* antibodies [1] or antigens [18], PCR [19] methods, and examination of large amounts of feces with isolation of eggs in a Percoll gradient [5]. Molecular methods have not been properly evaluated for sensitivity since current parasitological methods themselves lack sensitivity and few of them have undergone extensive field evaluations [17]. Assays for detection of antigens may not have the expected high sensitivity and specificity when employed for diagnosis in low endemicity areas or in light infections of travelers [18,20].

In the southernmost transmission focus of schistosomiasis in Brazil, most of the infected individuals examined had less than 1 epg and were usually diagnosed only after examination of several samples with increasing amounts of feces [2]. Efforts to develop a much more sensitive detection method originated with the idea of collecting and examining the entire evacuation of individuals who are of high epidemiological risk but who have consistently tested negative by copro-parasitological examinations.

Table 2. Percentage of *S. mansoni* eggs recovered in supernatant (SN) and pellet (SD) after seeding experiments with different combinations of biotinylated lectins and interaction with paramagnetic beads covered with streptavidin.

| Lectins | SN | SD |
|------------------|----|----|
| Ca+Ue | 3 | 97 |
| Ca+Ah | 5 | 95 |
| Ca+Tv | 23 | 77 |
| Negative control | 1 | 99 |
| Eu+Ah | 6 | 94 |
| Ca+Le | 6 | 94 |
| Eu+Tv | 7 | 93 |
| Negative control | 2 | 98 |
| Eu+Lé | 4 | 96 |
| Ah+Tv | 2 | 98 |
| Ah+Lé | 2 | 98 |
| Tv+Lé | 1 | 99 |
| Negative control | 27 | 73 |

For every of three experiments, there was a negative control: eggs and beads without lectins.

Triticum vulgare (Tv); *Concavalin A* (Ca); *Ulex europeus* (Ue); *Arachis hypogaea* (Ah); *Lycopersicum esculentum* (Le)

doi:10.1371/journal.pntd.0000073.t002

Attempts were made to isolate eggs from large final fecal sediments using sucrose density columns and paramagnetic beads covered with anti-*S. mansoni*-egg-surface antibodies raised in rabbits without success (data not shown). Using the Helmintex method described here, efficient isolation was achieved when lectins were used as ligands to the paramagnetic beads. Isolation of the eggs was also unexpectedly achieved when only beads and eggs were incubated (negative control), suggesting that ligands were unnecessary for isolation of the eggs. Although a detailed explanation of the mechanism of isolation is lacking, it clearly depends on the magnetic field and the presence of paramagnetic beads since eggs alone did not migrate to the magnet. It is possible

Table 3. Percentage of *S. mansoni* eggs recovered in supernatant (SN) and pellet (SD) after three repetitions of seeding experiments: paramagnetic microspheres covered with different ligands, latex beads covered with Protein A and egg suspension as negative control.

| Repeat | SN or SD | Negative control | Paramagnetic beads covered with | | | Latex beads covered with Protein A | Positive control |
|--------|----------|------------------|---------------------------------|--------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------|
| | | | Antibody anti-rabbit IgG | Streptavidin | Antibody anti-Cryptosporidium | | |
| 1st | SN | 99 | 36 | 3 | 34 | 98 | 1 |
| | SD | 1 | 64 | 97 | 66 | 2 | 99 |
| 2nd | SN | 100 | 24 | 3 | 55 | 94 | 0 |
| | SD | 0 | 76 | 97 | 45 | 6 | 100 |
| 3rd | SN | 91 | 39 | 0 | 57 | 99 | 6 |
| | SD | 9 | 61 | 100 | 43 | 1 | 94 |

A preparation resulting from the incubation of eggs with biotinylated lectins and interaction with magnetic beads covered with streptavidin was also included as a positive control.

doi:10.1371/journal.pntd.0000073.t003

Table 4. Eggs of *S. mansoni* recovered after seeding experiments where different numbers of eggs were mixed with 30g of normal human feces.

| Eggs per gram (Total eggs per 30 g) | 3 (0.1) | 7 (0.24) | 10 (0.34) | 20 (0.67) | 30 (1.0) | 40 (1.34) | 60 (2) |
|---|------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------|
| Repetitions | | | | | | | |
| 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 3 |
| 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 | 7 | 6 |
| 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| 6 | 0 | 3 | 0 | 2 | 5 | 10 | 3 |
| 7 | 1 | 0 | 2 | 0 | 7 | 5 | nd (*) |
| 8 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 6 | nd |
| 9 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 5 | nd |
| 10 | 0 | 3 | 2 | 1 | 4 | 5 | nd |
| Total eggs | 2 | 10 | 10 | 11 | 30 | 48 | 21 |
| Recovery (%) | 6.7 | 14.3 | 10.0 | 5.5 | 10.0 | 12.0 | 5,9 |
| Sensitivity | 20% | 50% | 50% | 60% | 80% | 100% | 100% |

(*) nd: not done

doi:10.1371/journal.pntd.0000073.t004

that the eggs were carried along with the beads as they aligned themselves with the force of the magnetic field and moved towards the magnet. It is not a highly specific interaction since a substantial amount of fecal debris also migrated towards the magnet. However, the reduction in the volume of final sediment and the concentration of eggs in this sediment appeared to be the basis for success of this very sensitive method.

The amount of feces (30 g) used for this test was arbitrarily chosen. It is anticipated that ongoing field tests of the method will demonstrate whether amounts larger than 30 g should be examined. This novel method is far more sensitive than other existing copro-parasitological tests. Nevertheless it is expected that additional modifications could be made that may further improve the performance of the Helminthex method. Although Helminthex is a relatively expensive (US\$ 0.80 per sample) and laborious method, it is more sensitive than KK. This method was able to detect 1.3 epg with 100% sensitivity while studies of KK indicate that its sensitivity is reduced to 60% at egg burdens lower than 100 epg [3]. Data

References

- Alarcón-de-Noya B, Cesari IM, Losada S, Colmenares C, Balzán C, et al. (1997) Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop* 66: 69–78.
- Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CK, Salvany AM, Brum CO, et al. (2004) The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian State, 1997 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73–78.
- Noya O, Alarcón-de-Noya B, Losada S, Colmenares C, Guzmán C, et al. (2002) Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low transmission. A review of a line of research. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(Suppl 1): 167–169.
- Corachan M (2002) Schistosomiasis and international travel. *Clin Infect Dis* 35: 446–450.
- Eberl M, al-Sherbiny M, Hagan P, Ljubojevic S, Thomas AW, et al. (2002) A novel and sensitive method to monitor helminth infections by faecal sampling. *Acta Trop* 83: 183–187.
- Polman K, De Vlas SJ, Gryseels B, Deelder AM (2000) Relating serum circulating anodic antigens to faecal egg counts in *Schistosoma mansoni* infections: a modeling approach. *Parasitology* 121: 601–610.
- Kretzer JW, Lehmann R, Schmelcher M, Banz M, Kim KP, et al. (2007) Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Appl Environ Microbiol* 73: 1992–2000.
- Zembutsu A, Waga S (2006) *De novo* assembly of genuine replication forks on an immobilized circular plasmid in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res* 34: e91.
- Gunderson SG, Haagensen I, Jonassen TO, Figenschau KJ, de Jonge N, et al. (1992) Magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J Immunol Methods* 148: 1–8.
- Moss DM, Arrowood MJ (2001) Quantification of *Cryptosporidium parvum* oocysts in mouse fecal specimens using immunomagnetic particles and two-color flow cytometry. *J Parasitol* 87: 406–412.
- Leatham AJ, Brooks SA (1988) Light microscopy: overview and basic methods. In: Rhodes JM, Milton JD, eds. *Lectin Methods and Protocols Human Press: New Jersey, USA*. 10 p.
- Beisler KG, Nakao M, Matsuda H, Tanaka H (1984) Characterization of the carbohydrates of *Schistosoma japonicum* adult worm, egg and cercaria by analysis of lectin binding and antibody reaction. *Jap J Exp Med* 54: 263–273.

Table 5. Identification of *S. mansoni* eggs by the methods of Kato-Katz and Helminthex in samples from two infected individuals from a new focus of intestinal schistosomiasis in Porto Alegre, southern Brazil.

| Patients | Kato-Katz | Helminthex |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Patient B (index case) | | |
| Sample 1 | 2 slides-negative | 3 slides-1 egg |
| Sample 2 | 2 slides-1 egg | 8 slides-61 eggs |
| Sample 3 | 2 slides-2 eggs | 10 slides-29 eggs |
| Totals | 6 slides-3 eggs | 21 slides-91 eggs |
| Patient A | | |
| Sample 1 | 2 slides-negative | 10 slides-negative |
| Sample 2 | 2 slides-negative | 10 slides-1 eggs |
| Sample 3 | 2 slides-negative | 10 slides-24 eggs |
| Totals | 6 slides-0 eggs | 30 slides-25 eggs |

doi:10.1371/journal.pntd.0000073.t005

presented in Table 5 indicated that approximately 30 times more eggs were recovered using Helminthex, than using KK, resulting in recoveries of 91 and 25 for Helminthex compared to 3 and 0 for KK, in patients B and A, respectively. The best performance of the egg hatching method was reported in the literature to have a sensitivity of 100% with 12 epg and 80% with 1 epg [21].

This novel detection method is not meant to replace other classical methods (e.g., thick smear KK) for *S. mansoni* screening. However, in low endemicity areas it may be part of a series of screening steps including epidemiological surveys with quantification methods of risk behavior, KK and serology. For case-control studies Helminthex will be useful as criterion of uninfected groups and, in travelers, it will improve the ability to make a definitive diagnosis in an ever increasing amount of people returning home after brief contact with transmission foci abroad resulting in a very light infection [3]. It may also serve as an extremely valuable tool to be used as the standard for evaluation of other diagnostic tests and vaccines.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CGT CFT RB. Performed the experiments: CFT RB EN JR. Analyzed the data: CGT CFT JR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CGT RB EN JR. Wrote the paper: CGT CFT.

13. Colditz IG, Jambre LF, Hosse R (2002) Use of lectin binding characteristics to identify gastrointestinal parasite eggs in faeces. *Vet Parasitol* 105: 219–227.
14. Robijn MLM, Wuhrer M, Korneles D, Deelder AM, Geyer R, et al. (2005) Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, adult worms and eggs. *Parasitology* 130: 67–77.
15. Ritchie L (1948) An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull US Army Med Depart* 8: 326.
16. Katz N, Chaves A, Pellegrino J (1972) A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med trop S Paulo* 14: 397–400.
17. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV (2004) Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol* 20: 35–39.
18. van Lieshout L, Polderman AM, Deelder AM (2000) Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Tropica* 77: 69–80.
19. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A (2003) Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 652–656.
20. Van Lieshout L, Gangaram Panday U, De Jonge N, Krijger FW, Oostburg BEJ, et al. (1995) Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic area of Surinam by determination of the circulating antigens CAA and CCA. *Acta Trop* 59: 19–29.
21. Zicker F, Katz N, Wolf J (1977) Avaliação do teste de eclosão de miracídeos na esquistossomose mansônica. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 19: 202–207.

CAPÍTULO 3

3.1- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1-PCR Convencional segundo Pontes e colaboradores (2002)

Primeiramente foi testada a eficácia de método de detecção de ácidos nucleicos, conforme descrito por Pontes e colaboradores (2002). Em síntese, aproximadamente 100 µL de uma suspensão com aproximadamente 2000 ovos de *S. mansoni* foram diluídos em 200 µL de tampão ROSE modificado para a extração de DNA. O tampão contém 10 mM TRIS, 270 mM EDTA em pH 8,0 e 1% de lauryl sulafto e 1% polivinilpirrolidona. A amostra foi levada ao vórtex por 5 min para realizar rompimento dos ovos. Após, a amostra foi incubada por 20 min a 95 °C. A amostra foi levada ao gelo por 1 min e centrifugada por 10 min a 8000 x **g** à temperatura ambiente. Foi separado 200 µL do sobrenadante, adicionado 500 µL de etanol (-20 °C), 10 µL de acetato de sódio 3 M (4 °C) e incubado por 2 h a 70 °C ou por 12 horas a 20 °C. O sobrenadante foi descartado após centrifugação a 8000 x **g** por 15 min, e o sedimento lavado com etanol 70 %. O sobrenadante foi descartado e o sedimento incubado a 37 °C por 15 min, e ressuspenso em 100 µL TE (10 mM TRIS e 1 mM EDTA). Como controle negativo foi extraído DNA de fígado de camundongo, tendo em vista que ovos utilizados na reação são provenientes da digestão deste órgão de camundongos infectados.

Para a amplificação do fragmento de 121 pb do *S. mansoni* (Hamburguer *et al*, 1991), foram utilizados os seguintes primers: direto 5'-GATCTGAATCCGACCAACCG-3' e reverso 5'-ATATTAACGCCACGCTCTC-3'. Foram utilizados 5 µL do DNA em mistura de reação com volume final de 50 µL, contendo 20 mM TRIS-HCl (pH 8,4), 50

mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5µM de cada primer, 200 µM dNTPs e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi realizada no termociclador PTC-100 TM Programmable Thermal Controller, de acordo com as seguintes condições: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 30 seg a 63 °C e 2 min a 72 °C. Após a amplificação, alíquotas de 10 µL do *amplicon* de 121pb foram aplicadas a gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5 x (Tris base 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e submetidas a eletroforese a 100 V por aproximadamente 1 h. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100 pb *ladder* (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio e observado através da transiluminação com luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação (GelDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

3.1.2- PCR em Tempo Real (qPCR) segundo Hove e colaboradores (2008)

3.1.2.1- Material Biológico

Para realização dos experimentos da PCR em tempo real foram separados diferentes grupos de amostras, conforme descrito abaixo:

Conjuntos de **1, 10, 20, 40 e 80** ovos de *S. mansoni*, foram separados através de pipetagem, de amostra de fezes de paciente infectado (amostra de paciente não identificado, fornecida mediante cooperação com o Programa de Controle de Esquistossomose da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais):

Grupo de Experimentos 1: ovos oriundos de fezes processadas por sedimentação espontânea, e suspensos em água destilada, com objetivo de avaliar a eficiência dos protocolos de extração de DNA testados;

Grupo de Experimentos 2: ovos oriundos de fezes processadas pelo Helmintex, preservadas em formalina 10%, e suspensos em água destilada;

Grupo de Experimentos 3: ovos oriundos de fezes não preservadas processadas pelo Helmintex, e adicionados em suspensão de 200µL de fezes com 2,5 µL da suspensão estoque de partículas paramagnéticas (Bangs Labs, EUA).

Grupo de Experimentos 4:

- 3 conjuntos de 80 ovos adicionados em 30 g de fezes não preservadas e processadas por todas as etapas do Helmintex e;

- 3 conjuntos de 80 ovos adicionados em 30 g de fezes não preservadas e processadas pelo Helmintex, porém sem a adição de partículas paramagnéticas.

Amostras de 1000 ovos de *S. mansoni* foram também separados com a finalidade de auxiliar a escolha do melhor protocolo de extração e posteriormente para a confecção da curva padrão da estimativa de concentração de DNA que será utilizada nas reações da PCR em tempo real.

Controles negativos:

1) amostra de fezes de indivíduo parasitado por *Ascaris lumbricoides* e *Enterobius vermicularis* (oriunda da sobra dos exames de rotina do Laboratório de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas – FIOCRUZ RJ); a amostra foi submetida à sedimentação espontânea e uma contagem, para estimar a quantidade de ovos presente nas fezes. Foram utilizados 200 µL de amostra para a extração;

2) 50 ovos de *Taenia spp.* e 50 ovos de *Fasciola hepatica*, separados de uma amostra de uma mistura de amostras de fezes do acervo didático do Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS.

3.1.2.2- Extração de DNA dos ovos de *S. mansoni*

Para a extração de DNA dos ovos de *S. mansoni* foram testados 4 protocolos conforme descrito na Tabela 3:

Tabela 3- Descrição dos protocolos de extração de DNA testados

| Protocolo | Especificação | Fabricante/Referência | Sigla |
|-----------|---|-----------------------|-------|
| 1 | <i>FAST DNA Kit</i> com modificações <i>Illustra Tissue and Cell</i> | MP Biomedicals | FD |
| 2 | <i>GenomicPrep Mini Spin Kit</i> | GE HealthCare | TC |
| 3 | <i>QIAamp DNA Stool Mini Kit</i> Pitcher (1989) e Silva (1999) com | Qiagen | QG |
| 4 | modificações | Oliveira, 2007 | OS |

Previamente à extração, todos os tubos contendo os ovos foram lavados, através de uma rápida centrifugação a 14 000 x g a temperatura ambiente e o excesso de sobrenadante foi retirado cuidadosamente para não remover os ovos.

Protocolo 1- *FAST DNA® Kit com modificações*

Este protocolo foi utilizado segundo instruções do fabricante, porém com algumas modificações: 1) no lugar dos tubos “Lysing Matrix A” (contendo uma matriz *garnet* e uma esfera de cerâmica – ¼ de polegada) que são fornecidos junto com o kit, foram utilizados os tubos “Lysing Matrix E” (contendo esferas de cerâmica (1,4 mm), sílica (0,1 mm) e vidro (4 mm), que de acordo com o fabricante são utilizados para

extração de DNA/RNA de amostras fecais; 2) para a homogeneização da amostra nos tubos Lysing Matrix é indicado a utilização do *FastPrep® Instrument*, porém substituímos pela utilização de vórtex na potência máxima por 5 min.

Inicialmente os ovos foram lavados 3 vezes com PBS/EDTA. Ao final das lavagens o sedimento final ressuspendido em PBS foi transferido para os tubos Lysing Matrix E. Foram adicionados 20 µL de PVP 10%, 400 µL CLS-VF e 200 µL PPS. Os tubos com os sedimentos foram submetidos ao vórtex por 5 min, centrifugados a 14 000 x **g** por 10 min a temperatura ambiente, e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de *Binding Matrix*, e misturado por inversão. Após uma etapa de incubação por 5 min a temperatura ambiente, os tubos foram novamente centrifugados por 1 min a 14 000 x **g**, e o sobrenadante removido. O sedimento final foi ressuspendido em 500 µL SEWS-M e submetidos a mais uma etapa de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o DNA foi ressuspendido em 100 µL DES. Após incubação por 3 min a temperatura ambiente, o sedimento foi centrifugado por 1 min a 14 000 x **g** e o sobrenadante contendo DNA foi transferido cuidadosamente para outro microtubo. O DNA extraído foi armazenado á -20°C.

Protocolo 2- *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)*

Este protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante para extração de tecidos de animais, conforme descrito a seguir:

Após a etapa de lavagem, os ovos foram ressuspendidos em 50 µL de PBS e ao sedimento foi adicionado 50 µL da solução de lise 1 e 10 µL de Proteinase K e incubados por 1 h a 56°C. Para a remoção de RNA foi adicionado 5 µL de solução de

RNAse A (20 mg/mL) e incubado por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 500 µL da solução de lise 2 e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Cada amostra foi aplicada em tubos coletores contendo uma coluna que consiste de uma membrana de sílica que possui afinidade de ligação ao DNA. As amostras foram centrifugadas até que toda a amostra passasse pela coluna e o eluato foi descartado. O procedimento foi repetido mais uma vez com a adição de 500 µL de Solução de Lise 2 e logo após com 500 µL do Tampão de Lavagem. Nesta etapa após a coluna estar totalmente seca, ela foi transferida para outro microtubo, onde foi adicionado 200 µL de tampão de eluição pré aquecido a 70 °C, e incubado por 1 min a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas para coletar o DNA genômico isolado, que foi armazenado à -20 °C.

Protocolo 3- QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)

A extração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, seguindo o protocolo *DNA Isolation from Larger Amounts of Stool* e após o *Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection*.

Inicialmente, foi adicionado 1000 µL do tampão ASL em cada microtubo contendo os ovos após a etapa de lavagem, e logo após foram submetidos ao vórtex por 1 min. A suspensão foi aquecida a 95 °C por 5 min em banho-maria, levada ao vórtex por 15 seg e submetida a uma etapa de centrifugação a 16 000 x **g** por 1 min. Posteriormente, transferiu-se 1,2 mL do sobrenadante para um novo tubo, descartou-se o sedimento e um tablete de *Inhibitex* foi adicionado a cada tubo, que foram agitados no vórtex por 1 min para permitir que os inibidores fossem adsorvidos pela matriz *Inhibitex*. Logo após os tubos foram centrifugados novamente a 16 000 x **g** por 3 min. Todo o

sobrenadante foi transferido para um novo tubo, o sedimento foi submetido a mais uma etapa de centrifugação. Em um novo tubo foi adicionado 15 µL da solução de proteinase K, 200 µL do sobrenadante obtido da última centrifugação e 200 µL do tampão AL, submetidos ao vórtex por 15 segundos e incubado a 70 °C por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 400 µL de etanol absoluto (100%) ao tubo contendo o lisado, e este foi submetido ao vórtex. Todo o lisado foi transferido para um tubo coletor contendo uma coluna que consiste de uma membrana de sílica que possui afinidade de ligação ao DNA, e mais uma etapa de centrifugação a 16 000 x **g** por 1 min foi realizada. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão AW1 e realizada mais uma etapa de centrifugação. Logo após, foi adicionado 500 µL do tampão AW2 e mais uma centrifugação foi realizada. Todo o eluato foi descartado e 100 µL do tampão AE foi adicionado diretamente sobre a coluna, e uma incubação de 1 min a temperatura ambiente foi realizada. A última etapa de centrifugação foi de 16.000 x **g** por 1 min para eluição do DNA isolado, que foi armazenado à -20 °C.

Protocolo 4- segundo Pitcher (1989) e Silva (1999) com modificações

Este protocolo foi baseado no protocolo de extração segundo Pitcher, Saunders & Owen (Pitcher, *et al*/1989), com algumas modificações propostas por Silva (Silva, *et al* 1999), que neste trabalho, foi a adição de pérolas de vidro na etapa de lise celular, sendo as amostras submetidas à lise celular mecânica e química, acreditando que isso facilite o rompimento da superfície dos ovos de *S. mansoni*. Ao final da etapa de lavagens, os ovos foram ressuspendidos em 500 µL de solução de guanidina 5 M e adicionado pérolas de vidro (3 pérolas de 0,1 g). A mistura foi submetida ao vórtex por 5 min e incubados a temperatura ambiente por 10 min. Após a incubação os microtubos

foram resfriados no gelo por 2 min. Foi adicionado 250 µL de acetato de amônio 7,5 M e os microtubos homogeneizados por inversão algumas vezes, e novamente resfriados em gelo por 10 min. Foram adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e homogeneizados por inversão algumas vezes, seguido de centrifugação a 14 000 x **g** por 10 min. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo microtubo, onde foram acrescentados o mesmo volume de isopropanol, para precipitação do DNA. Os microtubos foram homogeneizados por inversão algumas vezes e centrifugados a 3 500 x **g** por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1000 µL de etanol 70% (v/v) por 3 vezes. Ao final das lavagens, os microtubos contendo DNA permaneceram emborcados em papel adsorvente. Após a secagem dos tubos, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL tampão TE (Tris-EDTA pH 8,0) e armazenado à -20 °C.

3.1.2.3- PCR em Tempo Real

A reação de amplificação foi realizada conforme descrito por Hove e colaboradores (2008). O fragmento a ser amplificado é de 99 pb, faz parte do gene da citocromo c oxidase subunidade 1 (Cox 1), que compõe o genoma mitocondrial do *S. mansoni* (número de acesso no *GenBank* NC002545). Para amplificação do referido alvo, foram utilizados “primers” e sonda (tecnologia *TaqMan*) conforme descrito na Tabela 4. A sonda foi marcada com o fluoróforo FAM na extremidade 5’, e com MGB (*Mino Groove Binder*) na extremidade 3’.

Tabela 4- Sequência de oligonucleotídeos dos “primers” e sonda *TaqMan* para amplificação do gene da Cox 1

| Primers e Sonda | Sequência de Nucleotídeos |
|----------------------------|---|
| Primer Direto (Smcyt748F) | 5'-CCCTGCCAAATGAAGAGAAAAC-3' |
| Primer Reverso (Smcyt847R) | 5'-TGGGTGTGGAATTGGTTGAAC-3' |
| Sonda (Smcyt785T) | FAM 5'-CCAAAACCAGACCCCTCTCAAATTG-3' MGB |

A qPCR foi realizada em microplacas de 48 cavidades em um volume final de 20 μ L, no qual foi utilizado o Kit Taq Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Um volume de 5 μ L de DNA foi adicionado a 10 μ L do kit, contendo também os primers na concentração de 2 μ M cada um e a sonda a 2,5 μ M. A PCR foi realizada em um sistema de PCR quantitativo no termociclador Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA), onde a reação foi realizada através das seguintes condições: um passo inicial de incubação a 50°C por 2 min e 95°C por 15 min, seguida de 50 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os dados da fluorescência foram coletados no final de cada ciclo. Para cada reação realizada, foi incluído um controle, chamado de branco, com ausência de DNA, a fim de verificar a veracidade da amplificação, e nenhum valor de *cycle threshold* (Ct) foi obtido após os 50 ciclos da PCR.

3.1.2.4- Curva padrão de concentração de DNA de *S. mansoni*

A fim de verificar o limite de detecção da reação relativo à concentração de DNA, foram realizados experimentos de quantificação relativa, baseado na curva padrão de concentração de DNA. O produto das extrações de 1000 ovos de *S. mansoni* foram dosados no Nanodrop Spectrophotometer ND 100, para determinação da concentração de DNA e posteriormente foi construída a curva padrão, a partir de diluição seriada na base 10 (100 ng a 10 fg).

3.1.2.5- PCR Convencional

Após a extração de DNA das amostras do Grupo 1, foi testado uma PCR convencional de cada conjunto de ovos (1, 10, 20, 40 e 80) extraído pelos 4 diferentes protocolos de extração. Foram utilizados 10 μ M de cada primer, 200 μ M.dNTP, 2 mM MgCl₂, 1x tampão, 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 3 μ L de DNA em uma reação com volume final de 50 μ L. A reação foi desenvolvida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) nas seguintes condições: 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C e 1 min a 72 °C. Alíquotas de 10 μ L do produto final da PCR foram aplicadas em um gel de agarose a 2,0% em tampão TBE 0,5 x (Tris base 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) e submetidas à eletroforese a 100 V por aproximadamente 1 h. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100 pb *ladder*

(Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio e observado através da transiluminação com luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação.

3.2 RESULTADOS

3.2.1- PCR Convencional segundo Pontes e colaboradores (2002)

A PCR convencional segundo Pontes, 2002 foi a primeira reação descrita para diagnóstico do *S. mansoni* em amostra de fezes e soro humanas, por isso, inicialmente foi escolhida para testarmos sua eficiência como etapa de detecção de ovos após o Helmintex. A amostra de 2000 ovos de *S. mansoni* foi selecionada, pois serviria como um controle positivo para experimentos posteriores com baixas quantidades de ovos. Contudo, vários experimentos foram realizados e nenhuma amplificação foi obtida.

3.2.2- PCR em Tempo Real segundo Hove e colaboradores (2008)

3.2.2.1-Resultados do Grupo de Experimentos 1

Inicialmente foram testados 4 protocolos de extração de DNA, com a finalidade de verificar qual deles apresentaria melhor rendimento, tendo em vista a prevista dificuldade de liberação de DNA dos ovos de *S. mansoni* por possuírem uma membrana muito robusta e compacta. Além disso, estamos trabalhando com baixas quantidades de ovos, por isso é necessário que o processo promova o melhor rendimento possível. Com a finalidade de analisarmos o processo de extração em si, as amostras de ovos

foram diluídas em água destilada, evitando a interferência de inibidores presentes nas fezes.

A análise foi feita através da comparação dos resultados de Ct (*cycle threshold*) obtido na PCR em tempo real, onde Ct é o ciclo em que a reação cruza o limiar de detecção (*threshold*), ou seja, fase onde a intensidade de sinal de produto amplificado ultrapassou a intensidade da fluorescência encontrada no meio, referência passiva (ROX) presente no Master Mix. A fluorescência emitida após o limiar serve como um indicador da quantidade de *amplicons* produzida (Heid, *et al* 1996). As amostras foram testadas na concentração obtida após a extração, e diluídas 1:50, a fim de diminuir o efeito de inibidores.

Os resultados estão representados na Tabela 5, onde podemos observar que o protocolo 2 (*Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit*) obteve o melhor rendimento, com o sucesso da amplificação do gene da Cox 1 de *S. mansoni*, inclusive na amostra de 1 ovo. Quando comparado com os outros 3 protocolos, este apresentou os menores valores de Ct e foi positivo em todas as quantidades de ovos testadas.

Para auxiliar na escolha do melhor protocolo de extração, foram realizadas extrações com carga parasitária mais alta, com amostras contendo 1000 ovos de *S. mansoni* e adicionados em fezes. A Tabela 6 mostra os valores de Ct obtido em cada uma das amostras de 1000 ovos diluídas 1:50.

Tabela 5- Cts obtidos na PCR em Tempo Real, a partir da extração de DNA de conjuntos de ovos de *S. mansoni* suspensos em água destilada

| Protocolo | 1 ovo | | 10 ovos | | 20 ovos | | 40 ovos | | 80 ovos | |
|---------------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | S/dil | 1:50 | S/ dil | 1:50 |
| 1 (FD) | * | - | - | 33,9 | - | - | - | 33,6 | - | 35,0 |
| 2 (TC) | 29,4 | - | 24,4 | 27,2 | 23,8 | 26,0 | 22,9 | 25,1 | 22,8 | 24,0 |
| 3 (QG) | 34,5 | - | - | - | 28,6 | 30,5 | 27,0 | 29,0 | 25,0 | 27,3 |
| 4 (PS) | 41,1 | - | 34,8 | 35,0 | - | - | 33,7 | 35,6 | 38,9 | - |

* O traço representa Ct indeterminado

FD: Fast DNA Kit; TC: *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit*; QG: *QIAamp DNA Stool Mini Kit*; PS: Pitcher (1989) e Silva (1999) com modificações.

Tabela 6- Cts obtidos na PCR em Tempo Real, a partir da extração de DNA de conjuntos de 1000 ovos de *S. mansoni* adicionados em sedimento de fezes não infectadas

| Protocolo Extração | Sigla | Valor Ct |
|--------------------|-------|----------|
| 1 | FD | 27,81 |
| 2 | TC | 26,52 |
| 3 | QG | 34,29 |
| 4 | PS | 41,41 |

FD: Fast DNA Kit; TC: *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit*; QG: *QIAamp DNA Stool Mini Kit*; PS: Pitcher (1989) e Silva (1999) com modificações.

As amostras extraídas pelos Protocolos 1 e 2 foram as que apresentaram os melhores rendimentos, por isso foram utilizadas para construção da curva padrão de estimativa da concentração de DNA. Apesar de os 2 primeiros protocolos apresentarem valores semelhantes de Ct, o Protocolo 2 continua sendo o melhor dos quatro.

A PCR Convencional realizada para cada uma das amostras deste Grupo de Experimentos, não apresentou nenhuma amplificação, demonstrando uma já esperada maior sensibilidade da PCR em tempo real.

3.2.2.2-Resultados do Grupo de Experimentos 2

Em um primeiro momento, testamos a eficiência do processo de extração, com ovos coletados de fezes infectadas que passaram pelo processo de sedimentação espontânea, portanto, continham um pequeno sedimento fecal, que era trazido junto com os ovos, no momento de coletá-los e transferi-los para um microtubo com água. Contudo, eram somente detritos fecais e ovos. Como a finalidade é testar a PCR após o Helmintex, partimos para um segundo momento, em que coletamos ovos, nas mesmas quantidades testadas anteriormente, porém de fezes processadas pelo Helmintex e preservadas em formalina 10%. Estes ovos também foram suspensos em água destilada, porém desta vez, além dos resíduos de material fecal, também estão presente reagentes utilizados no método parasitológico (acetato de etila e partículas paramagnéticas) e o preservante das fezes (formalina). Os 4 protocolos de extração foram testados, e para todas as quantidades de ovos foram realizadas 4 extrações.

Das 4 extrações realizadas pelo Protocolo 2, somente uma amostra de 80 ovos apresentou amplificação, com Ct de 34,97. As amostras foram todas testadas com

diluições de 1:50, e alguma delas 1:100, pensando em diminuir o efeito de um possível inibidor da reação. Todas as 4 extrações com os outros 3 protocolos apresentaram Ct indeterminado, tanto para amostras sem diluição e diluídas 1:50.

As amostras do Grupo 2 apresentaram resultados insatisfatórios para a PCR, demonstrando a presença de algum provável inibidor da reação ou do processo de extração de DNA, inibindo a amplificação do gene alvo. Porém não sabemos quem atuou como inibidor, podendo ser componentes das fezes, assim como algum dos reagentes utilizados durante o Helmintex, ou até mesmo o preservante. Apesar disso, podemos observar um desempenho, provavelmente melhor, do Protocolo 2 de extração em relação aos outros testados, em virtude de ter sido o único a gerar pelo menos um resultado positivo.

3.2.2.3-Resultados do Grupo de Experimentos 3

As amostras do Grupo de Experimentos 1 e 2 testadas até o momento foram preparadas a partir de ovos (de diferentes origens) e adicionados em água destilada, e o processo de extração que apresentou melhor desempenho foi o Protocolo 2. Desta forma, este protocolo foi o escolhido para a continuidade dos experimentos.

Outra observação importante, feita a partir dos resultados anteriores, foi a provável presença de algum inibidor nas amostras do Grupo 2. Por isso, o Grupo 3 foi composto de amostras com as mesmas quantidades de ovos, porém adicionados em 200 µL de fezes e partículas paramagnéticas, onde pretendeu-se verificar a eficiência da reação na presença de ambos componentes, que estarão sempre presentes em quantidades consideráveis após o Helmintex. Foram realizadas 5 extrações de cada amostra de 1, 10, 20, 40 e 80 ovos de *S. mansoni*.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 7, e podemos observar que todas as quantidades de ovos testadas apresentaram amplificação da Cox 1, demonstrando que as fezes e as partículas paramagnéticas não inibem a reação. No entanto, quando comparado o resultado destas amostras, com o Grupo 1, que eram compostas de ovos em água, o Ct aumentou, provavelmente, resultado de alguma interferência com a suspensão contendo complexo conjunto de detritos e partículas.

O resultado da média do Ct nas diferentes quantidades de ovos testadas foi semelhante, não ocorrendo uma diminuição do Ct de pelo menos 1 ciclo à medida que o número de ovos aumentava. Isso pode trazer uma dificuldade para realizar uma relação entre a quantidade de ovos e o valor de Ct obtido. De acordo com a média de Ct das amostras diluídas 1:50, encontramos Ct= 34 para 1 ovo, Ct=33,6 para 20 ovos, Ct= 32,7 para 40 ovos e Ct= 33,5 para 80 ovos, demonstrando que em amostras de 80 ovos para baixo, o Ct médio foi de 33,45. Isso também ocorreu em amostras contendo uma maior quantidade de ovos, com Ct= 28,1 para 500 ovos (1:50), Ct= 26,5 para 1000 ovos (1:50) e Ct= 26,2 para 2000 ovos (1:50). O que esperava-se era que o valor de Ct diminuísse de maneira linear, a medida que aumentasse a quantidade de DNA alvo. (Heid *et al*, 1996). De acordo com os resultados observamos valores muito próximos do Ct, tanto para as baixas quantidades de ovos, quanto para as amostras de 1000 e 2000 ovos. Apesar dessa dificuldade, relação Ct *versus* quantidade ovos, a PCR mostrou-se positiva para todas as quantidades de ovos, mesmo na presença de fezes, inclusive em amostras contendo 1 ovo.

Foram realizadas 5 extrações de cada conjunto de ovos, onde esperava-se verificar a reprodutibilidade de todo o processo, ou seja, extração e amplificação do DNA. Observamos que a reprodutibilidade não foi linear, pois encontramos 100% de

positividade para os conjuntos de 10, 40 e 80 ovos de *S. mansoni*, com uma diminuição para 40% do conjunto de 20 ovos, conforme podemos ver na Tabela 7.

Tabela 7- Cts obtidos na PCR em Tempo Real, a partir da extração de DNA de ovos de *S. mansoni* em suspensão de 200µL de fezes com 2,5 µL de partículas paramagnéticas

| Extração | 1 ovo | | 10 ovos | | 20 ovos | | 40 ovos | | 80 ovos | |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | S/dil | 1:50 | S/ dil | 1:50 | S/ dil | 1:50 | S/ dil | 1:50 | S/dil | 1:50 |
| 1^a | 43,9 | 33,2 | 35,9 | 36,7 | 31,8 | 32,8 | 31,1 | 32,5 | 28,1 | 31,9 |
| 2^a | 34,5 | 34,8 | 31,9 | 33,8 | 30,7 | 34,5 | 33,3 | 32,1 | 29,3 | 33,8 |
| 3^a | - | - | 38,2 | 38,4 | - | - | 35,6 | 33,5 | 30,3 | 32,4 |
| 4^a | - | - | - | 36,4 | - | - | 40,9 | 32,5 | 31,9 | 35,9 |
| 5^a | - | - | - | 39,7 | - | - | - | 32,9 | 35,7 | - |
| Média | 39,2 | 34,0 | 35,3 | 37,0 | 31,3 | 33,6 | 35,3 | 32,7 | 31,0 | 33,5 |
| Reprodutibilidade | 40% | | 100% | | 40% | | 100% | | 100% | |

* O traço representa Ct indeterminado

3.2.2.4-Resultados do Grupo de Experimentos 4

O Grupo 4 foi formado por amostras oriundas do Helmintex, onde 3 repetições eram compostas de todas as etapas do Helmintex, e outras 3 processadas pelo Helmintex, porém sem a adição de microesferas magnéticas. A finalidade foi verificar se a presença delas promove alguma influência no resultado da reação da PCR. A comparação foi realizada em amostras contendo 80 ovos, em virtude de ser a amostra com maior número de ovos, onde estima-se haver uma melhor reprodutibilidade, desta forma, podendo avaliar melhor os resultados da PCR.

A Tabela 8 apresenta os resultados, e o que podemos observar é que as amostras diluídas apresentaram melhores resultados quando comparadas com as amostras sem diluição, que por sua vez apresentaram Cts muito alto, e a maioria (4/6) foram negativas. Analisando o resultado das amostras diluídas, observamos que aquelas que não apresentavam a última etapa do Helmintex, ou seja, sem microesferas magnéticas, obtiveram positividade nas 3 amostras testadas. No entanto o Ct médio foi de $34,46 \pm 1,14$, com ambos valores de Ct e desvio padrão mais altos do que aqueles obtidos para as amostras oriundas do Helmintex completo ($31,53 \pm 0,93$). Apesar destas amostras apresentarem 1 resultado negativo, elas indicam que as microesferas magnéticas não promovem a inibição da reação. Inclusive podem demonstrar que a utilização da última etapa do método do Helmintex promove mais um passo de limpeza do material fecal, diminuindo o efeito de inibidores presente nas fezes, conforme indicado pela diminuição do valor do Ct.

Tabela 8- Cts obtidos na PCR em Tempo Real, a partir da extração de DNA de 80 ovos adicionados em amostras processadas pelo Helmintex, com e sem a adição de partículas paramagnéticas

| Extração | 80 ovos (Helmintex Completo) | | 80 ovos (Helmintex s/ partículas paramagnéticas) | |
|----------------|---------------------------------|----------------|---|---------------|
| | S/dil | 1:50 | S/dil | 1:50 |
| 1 ^a | - | 32,2 | 38,8 | 37,0 |
| 2 ^a | - | 30,9 | - | 35,4 |
| 3 ^a | 41,0 | - | - | 30,9 |
| Média | - | 31,53 (± 0,93) | | 34,46(± 1,14) |

* O traço representa Ct indeterminado

3.2.2.5- Determinação da Especificidade

Para avaliação da especificidade, foram testados DNA de ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.* e *Fasciola hepatica*. Todas estas foram testadas nos 4 Grupos de Experimentos, e a amplificação do DNA de *S. mansoni* não foi detectado em nenhuma delas.

3.2.2.6- Determinação da Curva Padrão da Concentração de DNA

As amostras de 1000 ovos de *S. mansoni*, extraídas pelos Protocolos 1 e 2 foram dosadas e a partir da concentração resultante foram preparadas diluições nas concentrações de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg e 10 fg, (que

correspondem respectivamente a 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 fg), com a finalidade de verificarmos o limite de detecção da reação. Vários experimentos foram realizados, totalizando aproximadamente 30 repetições, e os resultados estão sumarizados na Tabela 8. As concentrações de 10^8 , 10^2 e 10^1 fg apresentaram Ct indeterminado em todas as repetições, e o Ct médio encontrado para as outras concentrações encontram-se na Tabela 9, assim como o desvio padrão e a reprodutibilidade de cada concentração. Como podemos observar, a reação apresentou um limite de detecção entre a faixa de 10 ng a 1 pg. Porém se analisarmos a reprodutibilidade da reação, observamos que a medida que a concentração de DNA diminui, esta também diminui, inclusive com um grande declínio da concentração de 10 pg para 1 pg. Além disso, o desvio padrão aumenta a medida que a concentração de DNA diminui, corroborando com a hipótese da diminuição da reprodutibilidade.

Tabela 9- Concentração de DNA e os respectivo valores de Cts

| Concentração DNA (fg) | Ct Médio (Desvio Padrão) | Reprodutibilidade |
|-----------------------|--------------------------|-------------------|
| 10^8 | - | - |
| 10^7 | 24,03 ($\pm 0,68$) | 100% |
| 10^6 | 27,24 ($\pm 0,74$) | 100% |
| 10^5 | 31,89 ($\pm 1,97$) | 100% |
| 10^4 | 36,04 ($\pm 2,53$) | 72,4% |
| 10^3 | 38,19 ($\pm 3,29$) | 13,8% |
| 10^2 | - | - |
| 10^1 | - | - |

* O traço representa Ct indeterminado

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, a esquistossomíase mansônica ocorre em vasta área endêmica, que se estende do Maranhão até Minas Gerais, também apresentando focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2010). A Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde dirige o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), que resumidamente tem como objetivos reduzir a ocorrência de formas graves e óbitos, reduzir a prevalência de infecção em áreas endêmicas, eliminar a transmissão em áreas isoladas de baixa intensidade de infecção e reduzir a expansão geográfica da infecção. Porém de acordo com a Organização Mundial da Saúde, várias dificuldades são encontradas para a execução de tal controle, e entre elas encontra-se a sensibilidade insuficiente dos métodos de diagnósticos (WHO, 2009). A existência de um método sensível é essencial para promover a identificação de indivíduos com baixa intensidade de infecção, que encontram-se presentes tanto em áreas de focos isolados, como o município de Esteio, quanto em áreas endêmicas, que após medidas de controle, apresentam redução da prevalência e intensidade da infecção.

O método de Kato-Katz (KK) ainda é a metodologia coparassitológica de escolha para o diagnóstico de *S. mansoni*, apresentando as vantagens de ser uma técnica de baixo custo, quantitativa e de procedimento simples, adequando-se bem em áreas endêmicas clássicas (Doenhoff *et al*, 2004). Contudo, é bem conhecido o fato que o KK apresenta sensibilidade insuficiente para o diagnóstico em áreas de baixa endemicidade, e em indivíduos com baixa intensidade de infecção (Pontes *et al*, 2002; Enk *et al*, 2008; Jurberg *et al*, 2008; Yu *et al*, 2007; Coelho *et al*, 2009). A pequena

quantidade de fezes analisada pelo método (aproximadamente 42 mg) talvez explique porque a técnica tem baixa sensibilidade para a detecção dos ovos, pois eles estão presentes em baixa frequência ou podem apresentar-se altamente agrupados no material fecal (Glinz *et al*, 2010). Baseado nesta hipótese, não somente o KK, mas todas as outras técnicas para diagnóstico de *S. mansoni* que utilizam pequenas quantidades de fezes irão apresentar o mesmo problema, de baixa sensibilidade.

Em virtude da necessidade de uma metodologia sensível e da tentativa de contornar a problemática do uso de pequenas quantidades de amostra fecal, foi que padronizamos o método de diagnóstico denominado Helmintex. Esta metodologia consiste de múltiplas etapas de concentração de ovos de *S. mansoni* em grandes quantidades de fezes (aproximadamente 30 g). Originalmente a detecção dos ovos no final de todo o processo é realizada através de visualização microscópica, onde é feita contagem dos ovos recuperados, podendo ser realizada a estimativa do número de ovos por grama de fezes (opg), conferindo ao método a vantagem de ser quantitativo.

A visualização microscópica utilizada como método de detecção apresenta a vantagem de ser uma técnica barata e conferir excelente especificidade, principalmente quando realizada por microscopistas experientes. Porém consome tempo e muitos ovos podem passar despercebidos, mesmo por indivíduos bem treinados (Turner, *et al* 2004). No caso do Helmintex, a sensibilidade foi estimada como 100% para quantidades decrescentes de ovos até o limite de 1,34 opg. No entanto a inconveniência é relacionada ao tempo gasto para realização do diagnóstico, pois o processamento de uma amostra gera em torno de 10 a 15 lâminas. Isso se torna problemático principalmente em casos de inquéritos parasitológicos, conforme vivenciado pela equipe do Laboratório de Biologia Parasitária, ao realizar o estudo populacional no município de Bandeirantes no estado do Paraná, onde o método foi

aplicado em aproximadamente 300 amostras (dados não publicados). Por isso, esforços rumo a uma nova alternativa para detecção dos ovos foram realizados, determinando a segunda etapa desse trabalho.

A primeira alternativa foi testar a aplicação da técnica de quimioluminescência para visualização dos ovos. Inicialmente, a idéia era promover a ligação de glicoproteínas presente na superfície dos ovos em lectinas biotiniladas, por conseguinte seria adicionado estreptavidina acoplada a peroxidase, e a detecção promovida através da quimioluminescência. Após a realização de alguns experimentos, foi observado que a presença de lectinas como ligante intermediário entre os ovos e a estreptavidina/peroxidase não era necessária. A partir de então novos experimentos foram realizados, porém a dificuldade de remoção de estreptavidina-peroxidase livre não permitiu um sistema com especificidade razoável. Além disso, pensou-se que no momento de testarmos esta técnica na presença de fezes, as dificuldades aumentariam muito. Por isso, como o objetivo deste trabalho desde o início foi a padronização de um método de diagnóstico, partimos para uma nova alternativa, a reação da polimerase em cadeia, para detectar a presença dos ovos através da demonstração da presença do DNA nos sedimentos produzidos pelo *Helmintex*. Apesar dos experimentos de quimioluminescência não apresentarem sucesso como método de diagnóstico, novas abordagens estão em curso pelo Grupo de Parasitologia da PUCRS, a fim de verificar a hipótese da afinidade da estreptavidina aos ovos de *S. mansoni* e a possibilidade de haver moléculas biotina-símiles na superfície dos ovos.

A técnica da PCR promove o diagnóstico de diversas doenças infecciosas e na maioria das vezes com uma ótima sensibilidade. Além disso, vários pesquisadores no momento que tomavam conhecimento do *Helmintex* e do tempo gasto para se fazer o diagnóstico através da leitura ao microscópio, indicavam a PCR como alternativa de

detecção, através da amplificação do DNA do parasito. Outra vantagem é que ela permite a detecção de várias amostras ao mesmo tempo, proporcionando automação. Em virtude dos motivos supracitados a PCR foi escolhida como método de detecção.

Ao iniciarmos os experimentos com a metodologia molecular, testamos a PCR convencional (Pontes *et al*, 2002), que foi a primeira padronizada para detecção de DNA de *S. mansoni* nas fezes. Porém nenhuma das amostras testadas foi amplificada, mesmo trabalhando com grandes quantidades de ovos diluídos em água destilada. Por isso, ao partirmos para a segunda tentativa de amplificação do DNA de *S. mansoni*, optamos por uma metodologia mais sensível, a PCR em tempo real, em virtude do objetivo deste trabalho ser a detecção de baixas quantidades de DNA do parasito.

Ao escolhermos a técnica da PCR, sabíamos que esta reação apresentaria vários fatores que poderiam gerar a falha da amplificação. Entre eles podemos citar erros de pipetagem, funcionamento indevido do termociclador e inibição da enzima *Taq* DNA polimerase por reagentes utilizados no processo de extração do DNA. Além disso, as fezes constituem um material com uma diversidade de substâncias que podem atuar como inibidoras, como resíduos alimentares, DNA da flora bacteriana intestinal e até mesmo DNA humano. As principais substâncias conhecidas por atuarem como inibidoras são: sais biliares, bilirrubina, polissacarídeos, lipídeos, grupo heme, componentes fenólicos e etc. (Wilson *et al*, 1997; Monteiro *et al*, 1997; Vanderberg *et al*, 2002). Por isso, pode-se dizer que um processo de extração de DNA de uma amostra de fezes é eficiente quando promove a liberação do DNA do parasito, seja de oocistos, cistos ou ovos e remove a maior quantidade possível de substâncias inibidoras (Silva *et al*, 1999).

Sabendo de tudo isso e que o material a ser extraído são ovos do parasito, decidimos avaliar 4 protocolos de extração. Analisando os resultados obtidos dos

Grupos de Experimentos 1 a 3, verificamos que o protocolo 2 (kit de extração comercial da GEHealthcare, *Illustra Tissue and Cell GenomicPrep Mini Spin Kit*) foi o que apresentou melhores resultados. Se observarmos o resultado do Ct da extração de DNA de 1000 ovos, o protocolo 1 (*Fast DNA Kit* com modificações) apresentou um rendimento similar. Porém ao analisarmos os resultados das amostras contendo baixas quantidades de ovos, protocolo 1 apresentou um declínio no seu rendimento. Além de apresentar o melhor rendimento, o protocolo 2 destacou-se entre os demais kits comerciais, por apresentar o menor custo (aproximadamente R\$ 9,00 por amostra), enquanto que os protocolos 1 e 3 o investimento foi de aproximadamente R\$ 30,00 e R\$ 15,00 respectivamente. Ainda apresentou a vantagem de consumir o menor tempo durante o processo de extração. Desta forma, nas condições testadas nesse trabalho, o protocolo 2 apresentou ser o melhor e mais adequado para a extração de DNA de ovos de *S. mansoni* em amostras de fezes.

A PCR em tempo real apresentou resultados satisfatórios para amplificação de DNA de *S. mansoni*, inclusive em amostras de fezes contendo somente 1 ovo. Porém, a partir dos resultados obtidos, onde os valores de Ct foram muito próximos para diferentes quantidades de ovos, não podemos considerar o caráter quantitativo da PCR. Podemos observar isso nas amostras de 1000 e 2000 ovos, que obtiveram Cts de 26,5 e 26,2 respectivamente, e nas amostras de 1 e 80 ovos, com valores de Cts de 34 e 33,5 respectivamente. Sabemos que o Ct diminui ou aumenta 1 ciclo a medida que o número de cópias iniciais é o dobro ou a metade (Heid *et al*, 1996) contudo nesse trabalho estamos trabalhando com amostras contendo ovos e não sabemos quantas cópias do gene alvo estão presentes em 1 ovo. Ou seja, estamos trabalhando com uma quantificação relativa, através da análise comparativa de Cts das amostras, gerando resultados relativos. Talvez seja uma explicação para o fato mencionado acima, e que

uma quantificação absoluta com a determinação do número de cópias, resultaria em Cts mais proporcionais a quantidade de DNA inicial.

Apesar da PCR em tempo real aqui testada não caracterizar-se como quantitativa, ela mostrou-se útil como método de detecção dos ovos, inclusive apresentando um limite de detecção de 1 pg de DNA de *S. mansoni*, porém com uma reprodutibilidade baixa, de 13,8%. Se considerarmos 100% de reprodutibilidade, a reação apresentou um limite na faixa de 10 ng a 100 pg de DNA.

Vale ressaltar ainda que ao compararmos os resultados do Grupo de Experimentos 1 e 3, o valor do Ct aumentou, provavelmente em virtude da presença de inibidores na amostra de fezes, que o Grupo 1 não apresentava. Por isso, a importância da aplicação de um método de concentração dos ovos anteriormente a PCR, que além de promover a concentração também auxilia na limpeza do material fecal, diminuindo o efeito dos inibidores, conforme visto nos resultados do Grupo 4 que apresentaram Ct menor para as amostras processadas por todas etapas do Helmintex.

Nos dias atuais, metodologias para detecção de DNA livre de célula estão em evidência, inclusive para detecção de *S. mansoni*, com reações padronizadas para detecção em amostras de plasma e urina (Enk *et al*, 2010; Kato-Hayashi *et al*, 2010; Wichmann *et al*, 2009). No entanto, ainda não se sabe qual o limite de detecção baseado na carga parasitária dos indivíduos infectados. Os trabalhos acima mencionam que são capazes de detectar DNA logo no início da infecção, porém não mencionam a intensidade de infecção e carga parasitária. Podendo estar novamente em frente ao problema da sensibilidade em situações de baixa carga parasitária.

A PCR é uma reação comprovadamente sensível, porém se considerarmos que amostras com baixa carga parasitária os ovos estão presentes em baixa frequência ou apresentam-se altamente agrupados no material fecal (Glinz *et al*, 2010) nos

deparamos com o mesmo problema dos métodos parasitológicos, ou seja, a pouca quantidade de amostra utilizada para a reação. Por isso, para adequarmos a sensibilidade da PCR nestas situações, se faz necessário a aplicação de um método de concentração que utilize grande quantidade de fezes, assim como o Helmintex.

Os resultados obtidos ao longo de todo este trabalho demonstram que este novo método de diagnóstico denominado Helmintex, apresenta ótima sensibilidade, até então nunca vista para métodos coproparasitológicos. Porém este método não irá substituir métodos clássicos, como o Kato-Katz, que apresenta as vantagens de ser uma técnica barata, fácil e quantitativa. A proposta é que com amostras negativas para Kato-Katz, com suspeita epidemiológica ou com sorologia positiva seja indicado um método mais sensível, como o Helmintex.

Ficou também bem demonstrado que o Helmintex é um método de concentração, e que a detecção dos ovos pode ser realizada por visualização microscópica ou pela amplificação do DNA do parasito pela PCR. Após analisar cada um dos métodos de detecção, pode-se dizer que ambos apresentam vantagens e desvantagens. A microscopia tem a vantagem de ser específica e quantitativa, porém necessita de pessoal experiente e o maior inconveniente é o tempo gasto para leitura de todo o sedimento fecal. A PCR apresenta como principal vantagem a possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo e de maneira mais rápida que a microscopia. É uma técnica sensível, porém apresenta algumas desvantagens: 1) a impossibilidade de calcular o numero de opg, sendo, portanto, uma técnica qualitativa; 2) o aumento do custo para realização de todo o diagnóstico, visto que a etapa de concentração feita pelo Helmintex também não é barata.

O novo método de diagnóstico descrito neste trabalho pode trazer melhorias no diagnóstico da esquistossomíase, principalmente em situações de baixa carga

parasitária dos indivíduos infectados. Além disso, apesar da PCR necessitar de novos experimentos para melhor avaliarmos seu desempenho, temos a opção de escolha entre dois métodos de detecção (visualização microscópica e PCR), após a aplicação de um método de concentração de ovos nas fezes, o Helmintex. Para tal escolha devemos analisar qual deles irá se adequar melhor à situação em que desejamos diagnosticar a infecção causada pelo *S. mansoni*, levando em consideração as vantagens e desvantagens de cada um.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Alarcón-de-Noya B, Cesari IM, Losada S, Colmenares C, Balzán C, Hoebeke J, Noya O. Evaluation of alkaline phosphatase immunoassay and comparison with other diagnostic methods in areas of low transmission of schistosomiasis. *Acta Trop.* 1997; 66: 69-78,

Beisler KG, Nakao M, Matsuda H, Tanaka H. Characterization of the Carbohydrates of *Schistosoma japonicum* Adult Worm, Egg and Cercaria by Analysis of Lectin Binding and Antibody Reaction. *Jpn J Exp Med.* 1984;54(6):263-273.

Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.* Aug 2002;18(8):337-342.

Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature.* Jul 2009;460:352-358.

Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Carvalho OS. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails. *Acta Trop.* 2009;111:1–6

Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL. First Report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 Jan;93(1):39-40.

Carlsgart J, Roepstorff A, Nejsum P. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. *Parasitol Res.* 2009;104:939-943.

Cesari IM, Ballen DE, Mendonza L, Matos C. Detection of *Schistosoma mansoni* Membrane Antigens by Immunoblot Analysis of Sera of Patients from Low Transmission Areas. *Clin.Diag.Lab.Immunol.* 2005 Feb;280–286.

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

Chand MA, Chiodini PL, Doenhoff MJ. Development of a new assay for the diagnosis of schistosomiasis, using cercarial antigens. *Trans Royal Soc Trop Med Hygn.* 2010;104:255–258

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

Colditz IG, Jambre LF, Hosse R. Use of Lectin binding characteristics to identify gastrointestinal parasite eggs in faeces. Vet Parasitol. 2002;105: 219-227.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(1):13-19.

Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1º edição. Rio de Janeiro:Editora Guanabara-Koogan; 2005.

Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? Trends Parasitol. 2004; 20:35-39.

Eberl M, Sherbiny M, Hagan P, Srdjan L, Thomas AW, Wilson RA. A novel and sensitive method to monitor helminth infections by faecal sampling. Acta Trop. 2002;83:183-187.

Edward JO, Kanamura HY, Lima DM. Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni in individuals with low worm burden. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(4):421-425.

Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. A salting out and resin procedure for extracting *Schistosoma mansoni* DNA from human urine samples. BCM Researches Notes. 2010;3:115.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Rev. Jan 2006;19(1): 165–256.

Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBS, Valar C, Moraes C, Garrido C, Amaral RS. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94:9-10.

Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CK, Salvany AM, Brum CO, Maurer RL, Mardini BLF, Jobim MB, Amaral RS. The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian State, 1997 to 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(1):73-78.

Glinz D, Silue KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, Rinaldi L, Cringoli G, N'Goran EK, Utzinger J. Comparing Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-Transmitted Helminths. Plos Neglect Trop Dis. July 2010; 4(7):e754.

Gomes ALV, Melo FL, Werkhauser RP, Abath FGC. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:133-136.

Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, Coelho PMZ, Rabello A. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. Mem Inst Oswaldo Cruz. Dec 2009;104(8):1194-1196.

Gomes LI, Marques LHSM, Enk MJ, Oliveira MC, Coelho PMZ, Rabello A. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of Schistosoma Infection in Feces. Plos Negl Trop Dis. April 2010;4(4):e664.

Hamilton JV, Klinkert M, Doenhoff MJ. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes parasitological and antigen detection methods. Parasitology. 1998;117:41-57.

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

Han ZG, Brindley PJ, Wang SY, Chen Z. Schistosoma Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009;10:211-240.

Harmon AF, Williams ZB, Zarlenga DS, Hildreth MB. Real-time PCR for quantifying *Haemonchus contortus* eggs and potential limiting factors. Parasitol Res. 2007.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6(10):986-94.

Hinrichsen SL. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. J Trop Med Hyg. 1934;9:283-298.

Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieyec L, Lieshouta L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans Royal Soc Trop Med Hygn.* 2008;102:179-185

Jannotti-Passos LK, Vidigal THDA, Dias-Neto E, Pena SDJ, Simpson AJG, Dutra WO, Souza CP, Carvalho-Parra JF. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snail. *J Parasitol.* 1997;83:395–399.

Jannotti-Passos LK, Magalhães KG, Carvalho OS, Vidigal THDA. Multiplex-PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomiasis). *J Parasitol.* 2006;92:426–429.

Jurberg AD, OLIVEIRA A, LENZI HL, COELHO PMZ. A new miracidia hatching for diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Feb;103(1):112-114.

Kanamura HY, Silva RM, Chiodelli SG, Glasser CM, Souza Dias LC. IgM-Imunofluorescence Test as a Diagnostic Tools for Epidemiologic Studies of Schistosomiasis in Low Endemic Areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(4):485-489.

Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, Chigusa Y. Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain Reaction. *Exp Parasitol.* 2010;124:325–329.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(3):303-308.

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

Kaiser, T. Atlas of Medical of Microbiology, 2005.

Le TH, Blair D, Agatsuma T, Humair PF, Campbell NJH, Iwagami M, D. Timothy J. Littlewood DTJ, Peacock B, Johnston DA, Bartley J, Zarlenga DS, McManus DP. Phylogenies Inferred from Mitochondrial Gene Orders—A Cautionary Tale from the Parasitic Flatworms. *Mol Biol Evol.* 2000 a;17(7):1123–1125.

Lambertucci JR. Esquistossomose Mânsonica. In: Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1º edição. Rio de Janeiro:Editora Guanabara-Koogan; 2005.

Le TH, Blair D, McManus DP. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes: the current status. *Int J Parasitol.*2000;30:283-290.

Libman MD, MacLean JD, Gyorkos JW. Screening for Schistosomiasis, Filariasis and Strongyloidiasis Among Expatriates Returnimga the Tropics. *Clin Infect Dis.* 1993;17:353-359.

Lier T, Simonsen GS, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Vennervald BJ, Johansen MV. Novel Real Time PCR for detection of *Schistosoma japonicum* in stool. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* Mar 2006;37(2):257-264.

LoVerde PT, Hiraib H, Merricka JM, Lee NH, El-Sayed N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Inter.* 2004;53:183–192.

Martin LK. Randomness of Particle Distribution in Human Feces and the Resulting Influence on Helminth Egg Counting. *Am J Trop Med Hyg.*1965;14(5):747-759.

Martinez E, Neves R, Oliveira R, Silva J, Rey L. Parasitological and morphological characteristics of Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* in *Mus musculus*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;77: 41-51.

Mckeand JB. Molecular diagnosis of parasitic nematodes. *Parasitology.*1998; 117:S87-S96.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS/DVE. Doenças infecciosas e parasitárias – Guia de Bolso. 8ª edição. Brasília:2010.

Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. *J Clin Microbiol.* Apr 1997;35(4):995–998.

Morgan UM, Thompson RCA. Molecular detection of parasitic protozoa. *Parasitology.* 1998;117:S73-S85.

Neves, DP. Parasitologia Dinâmica. 2ª edição. Belo Horizonte: Editora Atheneu; 2006. Cap 31 p. 227-247.

Neves DP, MELO AL, GENARO O & LINARDI PM. Parasitologia Humana. 9ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu; 1997. p 212-237.

Oliveira LMA. Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Amostras de Fezes para o Diagnóstico da Infecção pelo *Schistosoma mansoni*. [dissertação]. Rio de Janeiro(RJ):Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007.

Pereira MG, Atwill ER, Jones T. Comparison Of Sensitivity of Immunofluorescence Microscopy of a Combination of Microscopy and Immunomagnetic Separation of Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in Adult Bovine Feces. Appl Environ Microbiol.1999;3236-3239.

Pitcher DG, Saunders, NA, Owen, RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidine thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol.1989; 4:1513-1521.

Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by Polymerase Chain Reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in Human Serum and Feces. Am J Med Hyg. 2002;66(2):157-162.

Rey, L. Parasitologia. 3ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

Rey L. *Schistosoma* e Esquistossomose: Epidemiologia e Controle. Parasitologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991. Cap. 35. p. 389-410.

Ritchie L. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull US Army Med Depart.1948; 8:326.

Rhodes JM, Milton JD. Lectin Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine). New Jersey: Human Press;1998.

Robjin MLM, Wuhrer M, Korneles D, Deelder AM, Geyer R, Hokke CH. Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercarie, adult worms and eggs. Parasitology.2005;130: 67-77.

Sandoval N, Siles-Lucas M, Aban JL, Arellano JL, Gárate T, Muro A. *Schistosoma mansoni*: A diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. Exp Parasitol. 2006a;114:84-88.

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

Schlemper JBR, Ferreira Neto JA, Thiago PTS, Bressan C, Amarante AR. Distribuição Geográfica de Planorbídeos em Santa Catarina, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop.1996;29(5):411-418.

Silva A, Bornay-Llinares FJ, Moura INS, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and Reliable Extraction of Protozoan Parasite DNA from Fecal Specimens. Mol Diagn.1999;4(1):57-64.

Silva ACA, Graeff-Teixeira C, Zaha A. Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from será of patients. Ver Inst Med Trop S Paulo. 2003;45(5):295-297.

Sulahian A, Garin YJF, Izri A, Verret C, Delaunay P, Gool T, Derouin F. Development and Evaluation of a Western Bolt Kit for Diagnosis of Schistosomiasis. Clin Diagn Lab Immunol.2005;12(4):548-551.

Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okusawa E, Kanazawa T. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. Parasitol Int.2006; 55: 213-218.

Turner P, Lalloo K, Bligh J, et al. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. J Clin Pathol. 2004; 57:1193-1196.

Valli LCP, Kanamura HY, Da Silva RM, Ribeiro-Rodrigues R, Dietze ADR. *Schistosomiasis mansoni*: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. Am J Trop Med Hyg.1999;61:302-307.

Vandenberg N, van Oorschot RAH. Extraction of Human Nuclear DNA from Feces Samples Using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. J Forensic Sci. Sept 2002;47(5):993-995.

Van Lieshout L. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA e CCA, in particular in individuals with recent or light infections. Acta Trop.2000;77: 69-80.

Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, van Lieshout L, Polderman AM. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. J Clin Microbiol. Mar 2004;42(3):1220–1223.

Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Grevelding C, Drosten C. Diagnosing Schistosomiasis by Detection of Cell-Free Parasite DNA in Human Plasma. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e422.

Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol.*1997;63(10):3741-3751.

WHO, 2001. Report of the informal consultation on schistosomiasis in low transmission areas: Control strategies and criteria for elimination. London, 10–13, April 2000.

WHO, 2009. Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas Report of a WHO Informal Consultation. Salvador, Bahia, Brazil, 18-19, August, 2008

Woodstock L, Cook JA, Peters PA, Warren KS. Random Distribution of Schistosome Eggs in the Feces of Patients with *Schistosomiasis mansoni*. *Journal Infect Dis.*1971;124(6):613-614.

Yu JM, Vlas SJ, Jiang QW, Gryseels B. Comparison of the Kato-Katz technique, hatching test and indirect hemagglutination assay (IHA) for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China. *Parasitol Inter.*2007;56:45–49.

Zicker F, Katz N, Wolf J. Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo.*1977;19(3):202-207.