

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE
DOUTORADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

CATIELI GOBETTI LINDHOLZ

AVALIAÇÃO E DESCRIÇÃO COMPARATIVA DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA
ESQUISTOSSOMOSE E ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA DE *SCHISTOSOMA*
MANSONI

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS

CATIELI GOBETTI LINDHOLZ

**Avaliação e descrição comparativa de métodos diagnósticos da
esquistossomose e estudos de variabilidade genética de *Schistosoma
mansoni***

Porto Alegre
2019

CATIELI GOBETTI LINDHOLZ

Avaliação e descrição comparativa de métodos diagnósticos da esquistossomose e estudos de variabilidade genética de *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Carlos Graeff Teixeira

Porto Alegre
2019

CATIELI GOBETTI LINDHOLZ

Avaliação e descrição comparativa de métodos diagnósticos da esquistossomose e estudos de variabilidade genética de *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Martin Johannes Enk - IEC

Dra. Marilise Brittes Rott - UFRGS

Dra. Sílvia Dias de Oliveira - PUCRS

Porto Alegre
2019

A minha estrela mais linda, meu irmão
Alan Gobetti Lindholz (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família o amor, o carinho, a compreensão e o apoio em todos os momentos da minha vida, especialmente durante o último ano, com todas as superações que juntos enfrentamos, e, seguimos. Mãe, tu és o meu exemplo de integridade, batalha, independência e amor. Obrigada por existir na minha vida e ser o meu exemplo! Pai, sem o teu apoio e companheirismo nada disso seria possível. Obrigada por, dentro da tua simplicidade, entender as minhas escolhas e ser o meu suporte. Mano, minha metade, a melhor parte de mim. Tu foste o melhor presente que os nossos pais poderiam ter me dado! Sou imensamente grata por ter podido partilhar a vida contigo. Obrigada por me ensinar a insistir na minha felicidade. Eu sei que de alguma forma nós continuamos trilhando o caminho juntos...

Aos meus amigos, próximos ou distantes, pelo carinho, pelo encorajamento, pelas vivências. A minha irmã de alma e coração Sarjah, pela tua sinceridade, entrega, amor e sensibilidade. Tu és uma das flores mais lindas do meu jardim! À minha gringa Dani, pelas risadas que só tu sabes provocar, pelo teu companheirismo, por tu seres uma mulher de fibra e exemplo de dedicação e persistência na minha vida!

Ao meu companheiro Jefferson pelo amor, dedicação, amparo, paciência e tolerância, principalmente nos últimos meses. Obrigada por compreender minhas ausências e por me dar suporte nos momentos em que eu mesma não acreditei que poderia seguir a diante.

Ao meu filho de 4 patas Shiva, por compreender os passeios curtos ou ausentes durante os últimos tempos, por assistir meus ensaios das apresentações, e por me ensinar o sentido de amor e companheirismo verdadeiros. A mãe te ama, menino!

Ao meu orientador, Dr. Carlos Graeff Teixeira pela oportunidade, confiança, dedicação e entrega no desenvolvimento deste trabalho. Professor, lhe admiro pelo pesquisador e ser humano que és. Se um dia eu conseguir ser 10% do que o senhor é, estarei completamente realizada!

A Dra. Alessandra Morassutti pelo carinho, atenção, aprendizado e disponibilidade em ensinar. Obrigada Ale, por ser nosso porto seguro, pelas conversas, e por acreditar no meu potencial e me estimular a sonhar e voar alto.

A Dra. Bonnie Webster, pela orientação, dedicação, paciência e aprendizado durante o período de Doutorado Sanduíche no Museu de História Natural de Londres. Esta experiência foi incrível, e não seria tão enriquecedora sem as tuas instruções e amparo. Meus agradecimentos também a equipe da *Schistosomiasis Collection* pela recepção, atenção e coleguismo durante os quatro meses de convívio, especialmente a Kate Poulton, pela amizade e disponibilidade diárias.

As colegas e amigas do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, especialmente a Angélica Ramirez (*in memoriam*), Bianca Cognato, Carla Muller, Joana Borges, Renata Russo e a todos os alunos de iniciação científica pelo

crescimento diário, pelos almoços juntos, pelo aprendizado e agradável convívio ao longo desse período.

As amigas que a Parasito me apresentou, e que a vida reafirma o laço: Carolina Veríssimo, depois de nós, Londres nunca mais foi a mesma! Tu és meu exemplo de pesquisadora. Obrigada pelos ensinamentos, pela parceria, pelo enriquecimento no compartilhamento das ideias. Vanessa Fey, obrigada pela tua sinceridade, dedicação e envolvimento em tudo que se propõe a fazer. Sem a tua presença, não sei o que seria deste laboratório! Vivian Favero, minha dupla de Schisto, de projeto, de campo, de Tese. Obrigada pela tua dedicação, entrega, competência e companheirismo. As tuas batalhas Vivi, são sem dúvida, exemplo de superação e enfrentamento para todos que tem a oportunidade de conviver contigo! A vocês gurias, minha eterna gratidão pelos dias que vivemos em Estância, por todas as risadas e sofrimentos compartilhados no desenvolvimento deste trabalho, pelas infinitas horas realizando Helmintex, e por serem parte do meu crescimento e amadurecimento durante todo o Doutorado. Obrigada também pelos encontros cheios de risos, e pela parceria na cervejinha gelada, é claro!

A Secretaria Municipal de Saúde de Estância, especialmente a Equipe de Controle de Endemias do Município pelo suporte, amparo e auxílio no desenvolvimento das coletas e trabalhos de campo. A equipe de laboratório da Unidade Básica de Saúde Clóvis Franco, pelo espaço físico e suporte de pessoal durante as atividades desenvolvidas.

A direção da Escola Dr. Antonio Manuel de Carvalho Dantas pelo espaço físico disponibilizado às atividades com a comunidade, e pela solicitude no desenvolvimento das atividades de educação em saúde com os estudantes.

Ao líder comunitário de Candéal, Fábio Givanildo pela dedicação e envolvimento durante as atividades de campo.

A comunidade Candéal, por aceitar participar deste trabalho, pelo carinho, acolhimento e confiança depositados.

A PUCRS pela excelente estrutura acadêmica e física para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao *Natural History Museum of London* pela colaboração, estrutura e suporte durante o Doutorado Sanduíche.

Aos membros da banca avaliadora Dr. Martin Enk, Dra. Marilise Rott e Dra. Sílvia Dias, por aceitarem fazer parte deste trabalho.

A CAPES pelas bolsas concedidas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Aquele que quer aprender a voar, um dia precisa primeiro aprender a ficar de pé, caminhar, correr, escalar e dançar; ninguém consegue voar só aprendendo vôo.”

Friedrich Nietzsche

Avaliação e descrição comparativa de métodos diagnósticos da esquistossomose e estudos de variabilidade genética de *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é uma infecção que afeta cerca de 240 milhões de pessoas no mundo, e estima-se que mais de 700 milhões de pessoas vivam sob risco de infecção em áreas endêmicas. A visualização direta de ovos do parasito nas fezes do indivíduo infectado é o diagnóstico confirmatório, entretanto, resultados negativos não descartam a ocorrência de infecção, principalmente em áreas de baixa endemicidade, onde os indivíduos apresentam baixas cargas parasitárias, conseqüentemente, quantidade diminuída de ovos nas fezes, podendo levar a prevalências subestimadas, ou resultados falsos negativos quando aplicados métodos diagnósticos de baixa sensibilidade. Este foi um trabalho de critério amostral por conveniência, desenvolvido na localidade Candeal, Estância, Sergipe (Brasil), e teve como objetivo principal, avaliar métodos diagnósticos da esquistossomose mansônica no maior grupo amostral abordado fora do continente africano, utilizando como referência o método Helmintex, e estudar a diversidade genética entre isolados de *S. mansoni* geograficamente distintos. Os métodos utilizados na avaliação comparativa foram: Helmintex, Kato-Katz, teste rápido de urina POC-CCA e Western Blot utilizando o antígeno microssomal de vermes adultos (MAMA). As estimativas de prevalência encontradas foram de 40,6% (Helmintex), 11,9% (Kato-Katz), e 71,6% (POC-CCA). O Western Blot foi testado em um subgrupo de indivíduos infectados e não infectados, apresentando resultado de 76,8% de prevalência versus 56,5% diagnosticado pelo Helmintex, demonstrando a ocorrência de resultados falsos positivos, identificados majoritariamente em amostras com cargas parasitárias inferiores a 1 ovo por grama de fezes. Os resultados obtidos confirmam que o método Helmintex apresenta a maior sensibilidade na detecção de infecção por *S. mansoni* entre os métodos disponíveis, especialmente em situações de baixa carga parasitária, podendo ser utilizado como método de referência do diagnóstico da esquistossomose mansônica. As análises de diversidade genética abordaram cinco diferentes regiões brasileiras, e demonstram a presença de dois haplótipos, apontando para a ausência de diversidade genética significativa entre isolados dos Estados de Sergipe, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Quando comparadas geneticamente a isolados africanos, os isolados apresentaram maiores similaridades genéticas com amostras de Senegal e Nigéria, sugerindo a possível origem e diversificação dos parasitos hoje ocorrentes no Brasil, nestas regiões.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, Helmintex, diagnóstico.

Evaluation and comparative description of schistosomiasis diagnostic methods and genetic variability studies of *Schistosoma mansoni*

Schistosomiasis is an infection that affects about 240 million people worldwide, and it is estimated that more of 700 million people are at risk of infection in endemic areas. The direct visualization of the parasite eggs in the feces is the confirmatory diagnosis, however, negative results do not rule out the occurrence of infection, especially in areas of low endemicity, where the individuals present low parasitic burden, consequently, may lead to underestimated prevalence or false negative results when low sensitivity diagnostic methods are applied. This was a convenience criteria study, developed in Candeal, Estância, Sergipe (Brazil), and had as main objective to evaluate the diagnostic methods of schistosomiasis mansoni in the largest sampled group outside the African continent, using the Helmintex as reference method, and to study the genetic diversity between *Schistosoma mansoni* isolates. The methods used in the comparative evaluation were: Helmintex, Kato-Katz, POC-CCA urine rapid test and Western Blot using the adult microsomal antigen (MAMA). The prevalence estimates were 40.6% (Helmintex), 11.9% (Kato-Katz), and 71.6% (POC-CCA), respectively. Western Blot was tested in a subgroup of infected and uninfected individuals, presenting a 76.8% prevalence result, versus 56.5% diagnosed by Helmintex, demonstrating the occurrence of false positive results, identified mainly in samples with lower parasitic burdens to 1 egg per gram of feces. The results obtained confirm that Helmintex method presents the highest sensitivity in the detection of *S. mansoni* infection among the available methods, especially in situations of low parasitic burden, and it can be used as a reference method for the diagnosis of schistosomiasis. Genetic diversity analysis addressed five different Brazilian regions and demonstrated the presence of two haplotypes, pointing to the absence of significant genetic diversity among isolates from the states of Sergipe, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul. When compared genetically to African isolates, the samples presented greater genetic similarities with samples from Senegal and Nigeria, suggesting the possible origin and diversification of the parasites that currently occur in Brazil, in these African regions.

Key words: Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Helmintex, diagnosis.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	12
1.1	<i>Schistosoma mansoni</i>	12
1.2	Ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	13
1.3	Características genéticas de <i>Schistosoma mansoni</i> e o uso de marcadores moleculares no estudo de diversidade genética.....	15
2	Esquistossomose mansônica.....	17
3	Diagnóstico.....	18
3.1	Métodos parasitológicos.....	19
3.2	Métodos imunológicos.....	20
4	Local de estudo: obtenção de material biológico e processamento de dados.....	22
5	Objetivos.....	24
5.1	Objetivo geral.....	24
5.2	Objetivos específicos.....	24
6	Justificativa.....	25
7	Referências bibliográficas.....	26
Capítulo I: Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candéal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil.....		34
Capítulo II: Evaluating an adult microsomal antigen (MAMA) to detect <i>Schistosoma mansoni</i> infections in a highly endemic area in Candéal, Sergipe (Brazil).....		50
Capítulo III: Genetic diversity within <i>Schistosoma mansoni</i> : DNA barcoding reveals one genetic group in Brazil.....		63
ANEXO: Aprendizados e experiências obtidos durante o Doutorado.....		81
Considerações Finais.....		86
Perspectivas.....		90

Apresentação

A presente Tese de Doutorado é composta por três capítulos, e cada um deles é constituído por manuscritos publicados ou a serem submetidos a periódicos científicos, onde estão descritos os resultados obtidos neste trabalho. Inicialmente, a generalidade dos temas abordados nesta Tese é introduzida, juntamente com objetivos gerais e justificativas. Posteriormente, são apresentados os capítulos específicos, demonstrando os resultados encontrados em cada foco experimental proposto.

O Capítulo I apresenta a análise comparativa e o desempenho apresentado por três diferentes métodos diagnósticos da esquistossomose mansônica em uma área de alta prevalência no nordeste do Brasil. Os dados obtidos neste estudo estão compilados no manuscrito **“Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil”**, publicado no periódico *PLoS Neglected Tropical Diseases* em março de 2018. Neste estudo, foi analisado um grande número de amostras humanas para avaliar o desempenho dos métodos Helmintex, Kato-Katz e POC-CCA. Os resultados obtidos permitiram a determinação dos limites de detecção da infecção de acordo com as cargas parasitárias apresentadas, e a consequente demonstração de um método passível de ser considerado padrão ouro no diagnóstico da esquistossomose.

O Capítulo II apresenta a avaliação de desempenho do método Western Blot utilizando o antígeno microssomal de vermes adultos (MAMA) para o diagnóstico da esquistossomose, frente aos resultados obtidos com o método Helmintex. Neste capítulo estão descritos os principais resultados obtidos, que após o término das análises irão compor o manuscrito **“Evaluating an adult microsomal antigen (MAMA) to detect *Schistosoma mansoni* infection in a highly endemic area in Candeal, Sergipe (Brazil).”** Para a realização deste estudo foram selecionados soros de pessoas infectadas e não infectadas, cujos resultados foram analisados de acordo com as cargas parasitárias demonstradas pelo método Helmintex.

O Capítulo III é composto por estudos de diversidade genética de isolados brasileiros de *Schistosoma mansoni*, em comparação a isolados africanos

depositados na *Schistosomiasis Collection*. Estes estudos foram desenvolvidos durante o período de Doutorado Sanduíche na Divisão de Parasitos e Vetores do *Natural History Museum of London*. O Capítulo apresenta os principais achados, que após término das análises serão compilados no manuscrito intitulado “**Genetic diversity within *Schistosoma mansoni*: DNA barcoding reveals one genetic group in Brazil**”. Para realização do estudo, foram utilizadas amostras de vermes, cercárias, miracídios e ovos de *S. mansoni* provindos de duas regiões do Estado de Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Os resultados obtidos demonstram a ocorrência de um único grupo genético de parasitos no Brasil, com similaridade genética relacionada a isolados do Senegal e Nigéria. Os dados sugerem a inserção e dispersão parasito no Brasil, a partir do período de migração entre os dois continentes.

Os Capítulos II e III apresentam os resultados redigidos em português, os quais serão traduzidos e formatados, para posterior submissão aos periódicos *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* e *International Journal for Parasitology*, respectivamente.

Por fim, a presente Tese possui um anexo, no qual estão descritos os aprendizados e experiências obtidos durante o Doutorado, contemplando as vivências de campo, as colaborações com grupos externos e os manuscritos desenvolvidos em coautoria. Por fim, são apresentadas as considerações finais e perspectivas.

A banca examinadora é composta por: Dra. Sílvia Dias de Oliveira (Escola de Ciências - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), Dra. Marilise Brittes Rott (Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e Dr. Martin Johannes Enk (Laboratório de Parasitoses Intestinais e Malacologia - Instituto Evandro Chagas).

1. Introdução

1.1 *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, é um trematódeo digenético pertencente ao filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, Ordem Strigeiforme, Superfamília Schistosomatoidea e Família Schistosomatidae (Silva et al, 2008). O *S. mansoni* apresenta diferenças marcantes em relação aos demais trematódeos, uma vez que os indivíduos possuem dimorfismo sexual (Figura 1), embora tenham evoluído a partir de ancestrais hermafroditas (Combes, 1990).

Considerando as características morfológicas dos vermes adultos, a presença e posição de espículo nos ovos, as características do ciclo biológico e as especificidades pelos hospedeiros intermediários e definitivos, as espécies do gênero *Schistosoma* podem ser divididas em quatro grupos distintos, a saber: Grupo japonicum (*S. japonicum*, *S. sinensium*, *S. mekongi* e *S. malayensis*); Grupo haematobium (*S. haematobium*, *S. bovis*, *S. mattheei*, *S. margrebowiei*, *S. intercalatum* e *S. leiperi*); Grupo indicum (*S. indicum*, *S. spindale*, *S. incognitum* e *S. nasale*) e Grupo mansoni (*S. mansoni*, *S. rodhaini*; *S. hippopotami* e *S. edwardiense*) (Silva et al, 2008).

Figura 1: Vermes macho e fêmea de *Schistosoma mansoni* vistos em microscópio eletrônico.



Fonte: //www.sciencemag.org.

As principais espécies causadoras de infecções em humanos são *S. haematobium*, causadora de infecções no trato gênito-urinário, *S. japonicum* e *S. mansoni*, responsáveis por infecções intestinais, sendo o último o único agente etiológico encontrado no Brasil (Center for Disease Control and Prevention, 2018). Estes possuem ciclo de vida heteróxico, necessitando de um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo para completar seu desenvolvimento. Segundo Combes (1990), inicialmente estes parasitos se adaptaram a roedores, e diante das pressões evolutivas, ampliaram seus hospedeiros definitivos aos primatas não-humanos e atualmente aos humanos.

1.2 Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*

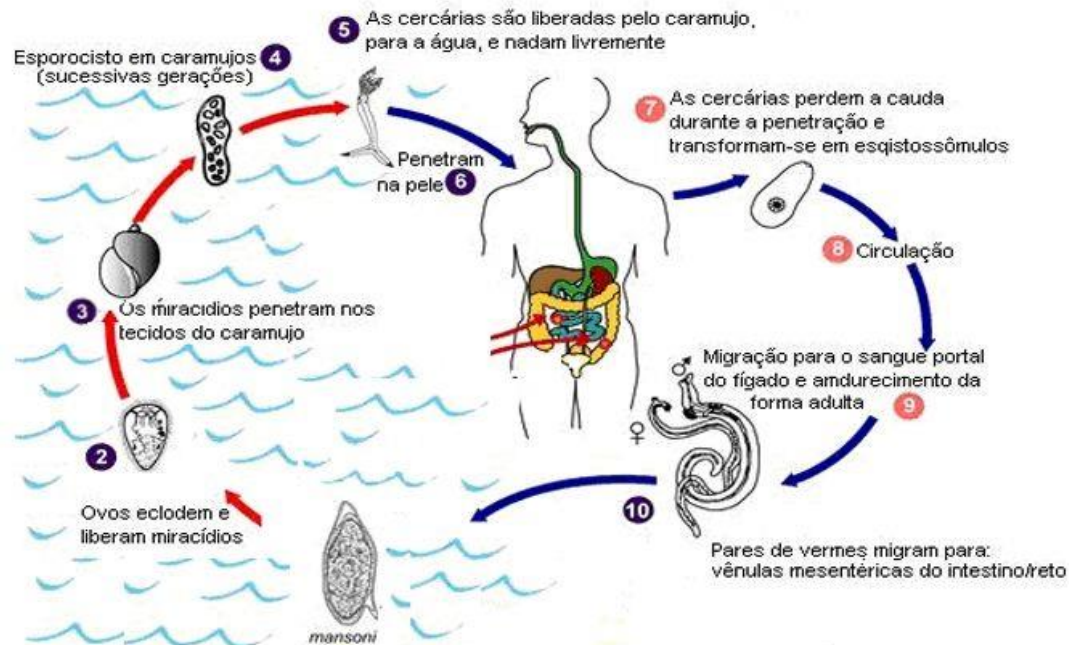
Os ovos de *S. mansoni* são bastante característicos. Medindo cerca de 150 µm de comprimento e 65 µm de largura, apresentam um formato “ovóide”, porção posterior mais volumosa, e um espinho lateral conspícuo e agudo, sendo esta uma característica confirmatória da presença do parasito em visualização microscópica. Cerca de 300 ovos imaturos são eliminados pelas fêmeas diariamente, no interior das veias mesentéricas inferiores. Estes atravessam o endotélio e membrana basal das veias, e após atravessam o epitélio do intestino, sendo excretados no meio externo juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo (Rey, 2001). Acredita-se que cerca de 50% do total de ovos postos conseguem percorrer o caminho até serem expelidos, completando assim o ciclo de vida (DeWalick et al, 2011). Após serem eliminados no meio, a sobrevivência dos ovos depende de fatores como consistência das fezes e temperatura do meio (Silva et al, 2008).

Após eclosão dos ovos, os miracídios nadam livremente até encontrarem o hospedeiro intermediário, moluscos aquáticos, em especial os do gênero *Biomphalaria* (Machado e Silva et al, 2008). Ao entrarem em contato direto com o molusco, os miracídios penetram em suas partes moles através de seus movimentos circulares. Durante as fases seguintes do desenvolvimento no interior do molusco, as células germinativas se reproduzem e sofrem diferenciação, mantendo o sexo do miracídio que as originou. Estima-se que um único miracídio pode gerar de 100 a 300 mil cercárias (Silva et al, 2008).

As cercárias apresentam cerca de 500 μm de comprimento, e uma organização complexa. Seu corpo alongado e cilíndrico, com uma cauda bifurcada é fundamental para seu deslocamento na água. A luz e o calor são fatores essenciais à eliminação das cercárias, ocorrendo preferencialmente nas horas mais claras do dia. Quando liberadas no meio, as cercárias respondem a diversos fatores ambientais, entretanto é consensual que quanto maior a atividade de locomoção na água, maior a probabilidade de encontrar o hospedeiro vertebrado, não sendo ainda demonstrada atração direta entre parasito e hospedeiro (McKerrow, 2003).

Uma vez ocorrida a penetração no hospedeiro vertebrado, o tegumento se especializa em absorver e secretar substâncias, em consequência da alteração do meio aquático para o meio complexo do hospedeiro, que, conseqüentemente, atuam como alvo de reações imunológicas do hospedeiro definitivo. Após atravessar a pele, e transformar-se em esquistossômulo, o parasito se desloca da epiderme em direção à derme, migra através da via sanguínea ou linfática até os pulmões, de onde se desloca, após dois ou três dias, para o fígado. Neste órgão os vermes adultos acasalam e migram para as veias mesentéricas do intestino, onde as fêmeas passam a liberar os ovos. Parte destes, quando liberados na luz intestinal, é eliminada juntamente com as fezes do hospedeiro, dando continuidade ao ciclo (Lenzi et al, 2008) (Figura 2).

Figura 2: Ciclo biológico de *Schistosoma* spp.



Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov

Fonte: Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>.

1.3 Características genéticas de *Schistosoma mansoni* e o uso de marcadores moleculares no estudo de diversidade genética

O *S. mansoni* apresenta um genoma diplóide, formado por sete pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais. As fêmeas são heterogaméticas, contendo um par de cromossomos ZW, enquanto os machos possuem o par ZZ (Short & Grossman, 1981).

O complexo de genes codificantes do RNA ribossomal (rRNA) foi a primeira região de DNA repetitiva descrita para *S. mansoni*. Este complexo, caracterizado como uma unidade repetida em tandem apresenta abundância em torno de 100 unidades a cada genoma haplóide. Desta forma, cada uma destas unidades codifica os três grupos conservados de rRNA eucarióticos (5,8S, 18S e 28S), intercaladas com DNA não transcrito (Simpson et al, 1984). A família de rRNA é polimórfica e apresenta cerca de 10% das unidades repetitivas, demonstrando heterogeneidade no tamanho destas sequências (Simpson et al, 1984). Desta forma, o estudo das

sequências de rDNA nuclear e rDNA mitocondrial (16S) de diversas espécies de *Schistosoma* são utilizados como alvo no desenvolvimento de fármacos que agem no bloqueio de funções mitocondriais, por exemplo. O aumento da disponibilidade de sequências completas de DNA mitocondrial também forneceu oportunidade de selecionar e desenvolver marcadores moleculares que permitiram a organização filogenética, além da discriminação interespecífica, entre isolados e até mesmo em populações de *S. mansoni* (McManus & Hope, 1993; Lockyer et al, 2003; Ballard & Whitlock, 2004; Culleton et al, 2011).

Dentre os marcadores mitocondriais mais explorados e conhecidos atualmente, ganha destaque na aplicação em estudos de genética animal o gene citocromo C oxidase subunidade I (*Cox I*) (Bueno-Silva, 2012). As altas taxas evolutivas apresentadas por este marcador e o fato de este ser “espécie-específico” contribuíram para que se tornasse um marcador universal aplicado em análises moleculares, permitindo sua utilização em estudos de taxonomia, filogeografia, código de barras genético, reconstrução e esclarecimento da história demográfica e diversificação adaptativa de inúmeras espécies (Hebert et al, 2003).

Em espécies de platelmintos com hábito parasitário (Neodermata), os genes codificadores de mtDNAs são altamente conservados. A exemplo disto, já foram caracterizados cestodas, e grande parte dos trematódeos descritos, compartilhando o mesmo arranjo genético (Park et al, 2007). Entretanto, alterações notáveis na ordem dos genes entre taxa próximos foram descritas em estudo de mtDNAs de parasitos do gênero *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea) (Webster & Littlewood, 2012). Anteriormente a este trabalho, Le e colaboradores (2000) descreveram arranjos genéticos de *S. japonicum* e *S. mansoni*, demonstrando diferenças marcantes entre as espécies, sendo que *S. japonicum* apresentou características mais próximas a outros cestodas, enquanto *S. mansoni* se distanciou geneticamente do grupo. Em outro estudo, quando realizada comparação pareada entre mtDNAs, foram demonstradas alterações na sequência de DNA através de eventos de translocação e rearranjos de genes, ordenando as espécies *S. japonicum*, *S. malayensis* e *S. mekongi* como plesiomórficas em comparação com os genomas modificados, considerados derivados (Littlewood et al, 2006).

As variações ocorrentes nos mtDNAs destes parasitos têm sido muito utilizadas em estudos sistemáticos e de caracterização de novos isolados, uma vez que podem demonstrar ocorrências de alterações genéticas raras e particulares de cada

cepa (Boore & Fuerstemberg, 2008). A utilização de técnicas relativamente simples, como o sequenciamento genético de diferentes amostras de vermes adultos de *Schistosoma* e comparação dos achados frente a banco de dados pode estabelecer o ordenamento mitocondrial entre os genes, classificando filogeneticamente os diferentes isolados deste gênero, podendo esclarecer as alterações ocorridas durante a radiação evolutiva de *Schistosoma* (Morgan et al, 2003; Webster & Littlewood, 2012).

Além das características genéticas particulares entre as cepas de *Schistosoma*, o comportamento dos parasitos em seus hospedeiros também se mostra particular e característico conforme o isolado em questão. Fatores como a migração pelo sistema porta-hepático (Valadares et al, 1981), dinâmica de eliminação de ovos nas fezes, e taxas de maturação de cercárias (Warren, 1967) já foram descritos para alguns isolados de *S. mansoni*, apresentando resultados distintos entre si (Valadares et al, 1981).

2. Esquistossomose mansônica

A esquistossomose, ou bilharzíase, é uma infecção que afeta cerca de 200 milhões de pessoas mundialmente, e estima-se que mais de 700 milhões de pessoas vivam sob risco de contaminação em áreas endêmicas (World Health Organization, 2013). As manifestações clínicas podem apresentar sintomas agudos ou crônicos, dependendo do estágio de infecção. Nas formas leves, os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos, especialmente nas áreas endêmicas, submetidos a tratamentos constantes. As formas crônicas da doença são menos comuns, e geralmente se apresentam com quadro de hepatoesplenomegalia e outros sinais de hipertensão porta (Ministério da Saúde, 2014), resultando em níveis de morbidade significativos, e impactos socioeconômicos e na saúde de comunidades empobrecidas (Weerakoon et al, 2015).

A esquistossomose mansônica apresenta ampla ocorrência, estando presente em 56 países distribuídos pela África, Oriente Médio, Índias Ocidentais e América do Sul (WHO, 2018). Evidências apontam para uma possível origem asiática do parasito, com dispersão para África, e após, para outros países (Lawton et al, 2011). As regiões mais propícias à infecção são classicamente caracterizadas por

apresentar condições sanitárias ausentes ou precárias, aliadas a altos níveis de pobreza e baixos níveis de educação. No Brasil, estima-se que 1,5 milhão de pessoas estejam infectadas pelo parasito. Entre os anos de 2008 e 2016, programas de vigilância da esquistossomose examinaram cerca de 9 milhões de indivíduos. Durante este período, 4.473 óbitos foram registrados, totalizando cerca de 500 óbitos anuais pela doença (Ministério da Saúde, 2017).

A introdução da esquistossomose se deu através do tráfico de escravos provindos da costa ocidental africana, que ingressaram no país principalmente pelos portos de Recife e Salvador, e tinham como destino o trabalho nas lavouras de cana-de-açúcar do nordeste brasileiro. Partindo destas regiões, a doença se expandiu primeiramente ao restante da região nordeste do país, formando extensas áreas de transmissão entre os Estados da Bahia e Rio Grande do Norte. Anos mais tarde, com o início do ciclo do ouro, o intenso fluxo migratório introduziu a endemia nos estados do sudeste brasileiro (MS, 2013). Somando-se a estes, atualmente existem focos isolados de transmissão nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MS, 2013). Uma vez introduzida, e tendo encontrado condições ambientais e hospedeiros intermediários favoráveis à transmissão (caramujos do gênero *Biomphalaria*, das espécies *Biomphalaria straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*), a esquistossomose constituiu um importante problema de saúde pública, onde áreas endêmicas e focais abrangem 19 das 27 Unidades Federadas (MS, 2013).

3. Diagnóstico

A visualização direta de ovos do parasito nas fezes do indivíduo infectado é o diagnóstico confirmatório para esquistossomose. Entretanto, resultados negativos não descartam a ocorrência de infecção, em especial nas áreas de baixa endemicidade, onde os indivíduos apresentam baixas cargas parasitárias, resultando em quantidade diminuída de ovos nas fezes, podendo levar a prevalências subestimadas, prejudicando o controle da doença (Enk et al, 2008).

Além dos métodos parasitológicos, existem outros métodos diagnósticos disponíveis, a saber: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através da detecção de DNA do parasito nas fezes do hospedeiro (Sandoval et al, 2006), e detecção direta de antígenos no soro e na urina (Van Lieshout et al, 2000; Cesari et al, 2005).

Os últimos, entretanto, embora apresentem alguma eficácia, não demonstram a intensidade da infecção (em especial nas áreas de baixa endemicidade). Quando utilizadas técnicas sorológicas, outro fator agravante é a memória imunológica adquirida, o que implica na possibilidade de resultados falso-positivos após o tratamento e cura da infecção (Weerakoon et al, 2015).

3.1 Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos mais utilizados incluem etapas de filtração, concentração e visualização do sedimento fecal em microscopia óptica. Apresentam diversas vantagens quando comparados a métodos moleculares e sorológicos, destacando-se o baixo custo operacional e a praticidade de execução, podendo ser realizados em trabalhos de campo e/ou em situações de infraestrutura laboratorial escassa.

A técnica descrita por Lutz (1919) e aperfeiçoada por Hoffmann e colaboradores (1934), conhecida como Método da Sedimentação Espontânea (Hoffmann et al, 1934) permite a detecção, mas dificulta a quantificação dos ovos nas fezes. Por ser de fácil aplicação e apresentar baixo custo na execução, é comumente aplicada em rotinas laboratoriais. O método de centrifugação em éter etílico (Blagg et al, 1955) também pode ser utilizado para diagnosticar esquistossomose (somente qualitativo), entretanto é pouco aplicado em estudos populacionais. Esta técnica é baseada na sedimentação dos ovos por meio de um líquido de baixa densidade, usando a força gerada pela centrifugação.

A técnica de Kato-Katz é um método parasitológico amplamente utilizado, e recomendado pela Organização Mundial da Saúde em serviços de saúde e estudos epidemiológicos para diagnóstico de esquistossomose intestinal. O método consiste na clarificação de fezes frescas (42 mg) comprimidas em um orifício de um molde plástico e contra-coradas com verde de malaquita (Katz et al, 1972). A especificidade do método é próxima a 100%, entretanto sua sensibilidade varia conforme a intensidade da infecção. Outros fatores que afetam a sensibilidade da técnica são o número de amostras analisadas e número de lâminas preparadas para observação (Gray et al, 2011). Por este motivo a técnica apresenta bom

desempenho no diagnóstico de infecções com cargas parasitárias moderadas a altas. Entretanto, quando aplicado em áreas de baixa endemicidade, sua utilização pode apresentar resultado falso-negativo, deixando de diagnosticar casos de baixa carga parasitária, com consequente subestimativa das taxas de prevalência, quando empregado em estudos epidemiológicos (Enk et al, 2008).

O método de gradiente salino consiste na sedimentação diferencial de 500mg de fezes, que transitam por meio de um lento e contínuo fluxo de solução salina a 3% durante o período de aproximadamente uma hora. Este método tem apresentado maior sensibilidade em estudos de campo quando comparado ao método de Kato-Katz (Coelho et al, 2009).

Um importante avanço na aplicação de métodos parasitológicos foi o desenvolvimento do método Helmintex (HTX), técnica coproparasitológica desenvolvida para aumentar a sensibilidade de métodos com detecção direta de ovos. O método, desenvolvido pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, apresenta sensibilidade de 100% para cargas de ovos superiores a 1,3 ovos por grama de fezes, e consiste no processamento de 30 g de material fecal, através de uma sequência de passos de filtragem e concentração, que é finalizado com o isolamento dos ovos através da interação com esferas superparamagnéticas em um campo magnético (Teixeira et al, 2007). Em adição a isto, Favero e colaboradores (2017) recentemente propuseram uma otimização do método HTX, o tornando menos trabalhoso, reduzindo o tempo na sua aplicação e leitura ao microscópio óptico.

3.2 Métodos imunológicos

Técnicas de imunodiagnóstico podem ser aplicadas na detecção de antígenos circulantes do parasito, ou então na detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro, sendo que as preparações antigênicas são, em sua maioria, produzidas a partir dos variados estágios de vida do parasito. Dificuldades como produtividade e obtenção dos antígenos, elevada instabilidade em condições simples de estocagem, capacidade antigênica, especificidade e o alto custo financeiro são alguns aspectos

que dificultam a aplicação de testes sorológicos em largas escalas (Doenhoff et al, 2004).

As moléculas antigênicas mais utilizadas são produzidas a partir de extratos brutos, preparados através da ruptura dos tecidos de vermes adultos, larvas ou ovos. O “*soluble worm adult protein*” (SWAP) é a fonte mais abundante e de fácil obtenção de material antigênico (Doenhoff et al, 2004). O “*soluble egg antigen*” (SEA) apresenta elevado número de frações antigênicas, apesar de somente a minoria desses compostos serem liberados por ovos viáveis (Ashton et al, 2001). Embora os antígenos SWAP e SEA apresentarem vantagens na produção e obtenção de moléculas antigênicas, estas moléculas apresentam limitações devido à ocorrência de reações cruzadas, uma vez que antígenos brutos contêm frações antigênicas compartilhadas entre diversos parasitos, limitando sua capacidade diagnóstica. Esta limitação, aos poucos, tem sido minimizada com a utilização de antígenos imunoquimicamente purificados, capazes de capturar anticorpos, conferindo maior especificidade e assim, sendo aplicados em técnicas imunológicas. A exemplo disto está o “*adult microsomal antigen*” (MAMA). Este antígeno é considerado uma boa molécula-alvo, devido às baixas taxas de reatividade cruzada apresentadas (Tsang et al, 1983) e capacidade de discriminar a fase aguda da doença (Tsang et al, 1984). Atualmente, o antígeno MAMA é utilizado pelo *Center for Disease Control and Prevention* (EUA) na triagem de pacientes que estiveram em áreas endêmicas de esquistossomose, e em casos onde testes de fezes e urina apresentam diagnóstico inconclusivo.

Antígenos excretados ou secretados pelo *S. mansoni* são bons indicadores de infecções ativas, reduzindo a possibilidade de resultados falso-positivos. Atualmente, os estudos utilizando antígenos circulantes têm como alvo dois principais componentes: CCA (Antígeno Catódico Circulante) e CAA (Antígeno Anódico Circulante). Inicialmente, o método utilizado para sua detecção foi o método de ELISA, com uso de amostras de soro (Polman et al, 1998; Al-Sherbiny et al, 1999). Anos mais tarde, a aplicação de uma técnica com reconhecimento de uma porção glicídica do CCA foi descrita, capaz de detectar este antígeno na urina (Vam Dam et al, 2004). A utilização deste método vem sendo testada em áreas endêmicas para a detecção de infecções ativas, uma vez que após o tratamento quimioterápico sua concentração reduz rapidamente no hospedeiro (Van't Wout et al, 1992; Van Lieshout et al, 1993). Entretanto, resultados apontam que a acurácia do POC-CCA

pode estar equivocada, especialmente em áreas com ocorrência de múltiplas infecções por *Schistosoma* (Obeng et al, 2008; Ashton et al, 2011; Sanneh et al, 2017), ou ainda quando o teste é aplicado em áreas de baixa endemicidade ou em casos de baixa carga parasitária (Peralta & Cavalcanti, 2018).

4. Local de estudo: obtenção de material biológico e processamento de dados

Os materiais biológicos (sangue, fezes e urina) utilizados nas análises comparativas de métodos diagnósticos descritos nos Capítulos I e II desta Tese foram coletadas na localidade Candéal, município de Estância, Sergipe, Brasil. Localizado na latitude 11° 16' 06"S e longitude 37° 26' 18"W, o município possui aproximadamente 64.000 habitantes, com área de 644 Km² (IBGE, 2015). O clima do município é tropical, com médias anuais em torno dos 30°C.

A comunidade Candéal é composta por aproximadamente 700 moradores, localizada ao sul do município, nas margens da rodovia federal (BR 101) e do rio Piautinga. A escolha da localidade se deu pela alta prevalência de casos de esquistossomose, com hipótese de ocorrência de ampla variação na intensidade da infecção, onde indivíduos da mesma região geográfica apresentam baixa, média e alta carga parasitária (Informação pessoal – Equipe de Controle de Endemias, Secretaria Municipal de Saúde de Estância; comunicação pessoal Dr. Carlos Graeff Teixeira). Os estudos a seguir descritos contaram, para sua realização, com apoio da Secretaria de Municipal de Saúde de Estância e da Unidade Básica de Saúde Clóvis Franco (Estância, Sergipe).

Foram incluídos no estudo indivíduos acima de um ano de idade, que após orientação e esclarecimentos sobre a pesquisa, tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), composto por duas vias, permanecendo uma de porte do participante (ou seu representante legal no caso de menores de 18 anos) e outra do Grupo de Pesquisa de Parasitologia Biomédica da PUCRS. Após assinatura dos termos, foram realizadas coleta de fezes, urina e sangue, as quais foram processadas e submetidas às análises subsequentes.

Os resultados de exames de fezes (confirmatório para a infecção por *S. mansoni*) foram distribuídos à população participante do projeto, que recebeu informações sobre o desenvolvimento da infecção e orientações sobre o tratamento.

Para a realização dos estudos descritos no Capítulo III desta tese, foram utilizadas amostras de cercárias, miracídeos e ovos provindos da localidade Candéal, obtidos durante a realização deste projeto. As amostras oriundas do município de Propriá (SE), e dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais foram obtidas com a colaboração entre a Secretaria Estadual de Saúde de Sergipe, a Universidade Federal de Minas Gerais e a Fundação Oswaldo Cruz, respectivamente.

As amostras representativas do Estado do Rio Grande do Sul foram originalmente isoladas no município de Esteio, cujo ciclo biológico é mantido no Laboratório de Biologia Parasitária da Escola de Ciências da PUCRS. Os hospedeiros intermediários utilizados são moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, cujas cercárias liberadas são utilizadas para infecção de camundongos *Swiss*, fazendo parte da rotina laboratorial. O projeto de manutenção dos animais infectados para experimentação conta com a devida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS (Registro 15/00443), e registrado sob o título “Manutenção do ciclo e produção de antígenos diagnósticos dos helmintos: *Schistosoma mansoni*, *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*”.

5. Objetivos

5.1 Objetivo geral

Avaliar métodos diagnósticos da esquistossomose mansônica, tomando como referência o método Helmintex e estudar a diversidade genética entre isolados de *S. mansoni* geograficamente distintos.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Comparar o desempenho entre os métodos parasitológicos Helmintex e Kato-Katz em uma população de área endêmica com alta intensidade de transmissão da parasitose, com estratificação de cargas parasitárias;
- 5.2.2 Comparar o desempenho entre os testes parasitológicos Helmintex e Kato-Katz com resultados apresentados pelo teste rápido de urina POC-CCA;
- 5.2.3 Descrever a distribuição de cargas parasitárias em uma população residente em área endêmica de alta prevalência;
- 5.2.4 Analisar o desempenho de teste sorológico Western Blot empregando o antígeno microssomal de vermes adultos (MAMA) frente aos resultados obtidos pelo método Helmintex;
- 5.2.5 Demonstrar a aplicação do método Helmintex como método de referência no diagnóstico da esquistossomose, através da análise comparativa desenvolvida no maior número de amostras coletadas fora do continente africano;
- 5.2.6 Realizar estudos de diversidade genética entre cinco isolados de diferentes regiões brasileiras, em comparação a isolados africanos depositados na *Schistosomiasis Collection* do *Natural History Museum of London*.

6. Justificativa

A comparação entre métodos diagnósticos da esquistossomose é atualmente uma proposta abordada por diferentes grupos de pesquisa no Brasil e no mundo. O presente estudo apresenta dados comparativos utilizando o maior número amostral até então obtido para uma área endêmica de esquistossomose fora do continente africano. Em áreas de média ou alta prevalência, a estratificação de cargas parasitárias é um fator importantíssimo na comparação de desempenho dos métodos, viabilizando a análise de resultados obtidos em número composto por diferentes cargas parasitárias. Neste contexto, os resultados deste trabalho almejam demonstrar a fragilidade contida nos métodos diagnósticos utilizados atualmente, em especial, as falhas na diagnose de casos positivos de baixa carga parasitária.

A inclusão de métodos imunológicos na comparação (POC-CCA e antígeno MAMA) nos permite estimar a especificidade, sensibilidade e os resultados falsos positivos e negativos de cada método. Embasados no grande número amostral e nos resultados apresentados por este projeto, nosso objetivo maior é demonstrar a utilidade do método Helmintex como um método de referência no diagnóstico da esquistossomose mansônica, tendo em vista que até o momento, nosso teste é o mais sensível descrito.

A necessidade de um teste diagnóstico sensível e específico é de extrema importância tanto na aplicação em levantamentos epidemiológicos, quanto no acompanhamento do tratamento e cura da esquistossomose mansônica. Neste sentido, o método Helmintex têm apresentado excelentes resultados quando comparado a outras metodologias parasitológicas (Caldeira et al, 2012; Pinheiro et al, 2012; Oliveira et al, 2018; Lindholz et al, 2018), e cada vez mais se mostra um teste sensível mesmo quando aplicado em situações de baixas cargas parasitárias.

O número de ovos liberados nas fezes, as taxas de maturação das cercárias, e as características clínicas da infecção, podem apresentar variações de acordo com o isolado em questão (Warren, 1967; Valadares et al, 1981). Neste contexto, as análises genéticas abordadas neste estudo se justificam pela necessidade de compreensão sobre as características apresentadas nas diferentes áreas de ocorrência da esquistossomose no Brasil, especulando as possíveis rotas de inserção e dispersão do *S. mansoni*, através da comparação dos isolados brasileiros com isolados provenientes de diversas regiões da África.

Considerando os aspectos de diversidade genética propostos, cabe ressaltar que cepas provenientes de regiões geográficas distintas apresentam diferenças no desenvolvimento do parasito e na agressividade da infecção. Embora os espécimes de *S. mansoni* sejam considerados morfológicamente uniformes no tamanho dos vermes, é sabido que entre as cepas, as taxas de reprodução do parasito, a patogenicidade e suscetibilidade ao tratamento são variáveis (Allen et al, 2002). Estas características, potencialmente refletem as diferenças na estrutura genética populacional e suas adaptações ao meio ambiente. Um estudo desenvolvido no Senegal usando marcadores de microssatélites demonstrou a distribuição aleatória de variação genética entre parasitos de diferentes lugares e hospedeiros, confirmando a idéia de que um homem infectado potencialmente é um reservatório de sub-populações de *Schistosoma* (Broeck et al, 2014). Assim, a ocorrência de variadas linhagens do parasito em uma mesma região tende a alterar a dinâmica de transmissão da infecção, podendo potencializar os níveis de patogenicidade e resistência a fármacos, uma vez que, na relação de convívio, a tendência natural é de que ocorra um processo de seleção genética, favorecendo fenótipos mais adaptados (MacManus et al, 2018).

7. Referências bibliográficas

- Albuquerque, W.R.D., Fraga-Filho, W. (2006). Uma história do negro no Brasil. Salvador: Centro de Estudos Afro-Orientais, Fundação Cultural Palmares. Brasília, Distrito Federal.
- Allen, G.P., Paul, B.B., Adrian, C.S., Richard, O., Yuesheng, L., Gail, M.W. (2002). Schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine*, 346 1212-1220.
- Al-Sherbiny, M.M., Osman, A.M., Hancock, K., Deelder, A.M., Tsang, V.C. (1999). Application of immunodiagnostic assays: detection of antibodies and circulating antigens in human schistosomiasis and correlation with clinical findings. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60 (6), 960-966.
- Ashton, P. D., Harrop, R., Shah, B., Wilson, R.A. (2001) The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology*, 122, 329-338.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- Blagg, W., Schoegel, E.L., Mansour, N.S., Khalat, G.I. (1955). A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 4, 23- 28.

Boore, J.L., Fuerstenberg, S.I. (2008). Beyond linear sequence comparisons: the use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. *Philosophical Transactions of a Royal Society B* 363, 1445-1451.

Broeck, F.V., Meurs, L., Raeymaekers, J.A.M., Boon, N., Dieye, T.N., Volckaert, F.A.M., Polman, K., Huyse, T. (2014). Inbreeding within human *Schistosoma mansoni*: do host-specific factors shape the genetic composition of parasite populations? *Heredity*, 113, 32-41.

Bueno-Silva, M. (2012). Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. *Estudos de Biologia, Ambiente e Diversidade* 34 (83), 157-163.

Center for Disease Control and Prevention, Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern - Schistosomiasis infection (2018). Recuperado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (2018). Parasites - Schistosomiasis: Epidemiology & Risk Factors. Recuperado de <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/epi.html>

Cesari, I.M., Ballen, D.E., Mendonza, L., Matos, C. (2005). Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low transmission areas. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 12(2), 280-286.

Coelho, P.M., Jurberg, A.D., Oliveira, A.A., Katz, N. (2009). Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 720-3.

Combes C. (1990). Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach. *Tree*, 5; 334-337.

Crellen, T., Allan, F., David, S., Durrant, C., Huckvale, T., Holroyd, N., Emery, A.M., Rollinson, D., Aanensen, D.M., Berriman, M., Webster, J.P., Cotton, J.A. (2016). Whole genome resequencing of the human parasite *Schistosoma mansoni* reveals population history and effects of selection. *Nature Scientific Reports* 6, 20954.

Culleton, R., Coban, C., Zeyrek, F.Y., Cravo, P., Kaneko, A., Randrianarivelosoa, M., Andrianaranjaka, V., Kano, S., Farnert, A., Arez, A.P., Sharp, P.M., Carter, R., Tanabe, K. (2011). The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One* 6, e29137.

DeWalick S., Bexkens, M.L., van Balkom, B.W.M., Wu, Y.P., Smit, C.H., Hokke, C.H., deGroot, P.G., Heck, A.J.R., Tielens, A.G.M., van Hellemond, J.J. (2011). The proteome of the insoluble *Schistosoma*. *International Journal Parasitology*, 41(5), 523-532.

Doenhoff, M.J., Chiodini, P.L., Hamilton, J.V. (2004). Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitology*, 20, 35-39.

Enk, M.J., Lustosa, Lima, A.C., Drummond, S.C., Schall, V.T., Coelho, P.M.Z. (2008). The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Tropica* 108, 222-228.

- Favero, V., Frasca Candido, R., De Marco Verissimo, C., Jones, M., St. Pierre, T., Lindholz, C.G., Da Silva, V.D., Morassutti, A.L., Graeff-Teixeira, C. (2017). Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. *Experimental Parasitology*, 177, 28–34 doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.001 PMID: 28431921.
- Fenwick, A., Webster, J.P. (2006). Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. *Current Opinion in Infections Diseases*, 19, 577-582.
- Gower, C.M., Gehre, F., Marques, S.R., Lamberton, P.H.L., Lwambo, N., Webster, J.P. (2017). Phenotypic and genotypic monitoring of *Schistosoma mansoni* in Tanzanian schoolchildren five years into a preventative chemotherapy national control programme. *Parasites & Vectors*, 10, 593. doi10.1186/s13071-017-2533-6.
- Graeff-Teixeira, C., Anjos, C.B., Oliveira, V.V., Velloso, C.F.P., Fonseca, B.S., Valar, C., Moraes, C., Garrido, C.T., Amaral, R.S. (1999). Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost brazilian state, Rio Grande do Sul. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (1), 9-10.
- Gray, D.J., Ross, A.G., Li, Y.S., MacManus, D.O. (2011). Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ Clinical Review*, 342.
- Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y., Chen, Z. (2009). *Schistosoma* Genomics: new perspectives on Schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 211-240.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S., de Waard, J.R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, 96-99.
- Hoffman, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L. (1934). The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* 9, 283-289.
- Kane, R.A., Rollinson, D. (1994). Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63, 153-156.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. (1972). A simple device for quantitative stool thicksmeat technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 14, 397-400.
- King, K.C., Stelkens, R.B., Webster, J.P., Smith, D.F., Brockhurst, M.A. (2015). Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. *PLoS Pathogens*, 11, e1005098.
- Knopp, J., Stothard, J.R., Rollinson, D., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Martib, H., Utizgera, J. (2013). From morbidity control to transmission control: time to change tactics against helminths in Unguja. *Acta Tropica*, 128, 412-422.
- Lawton, S.P., Hirai, H., Ironside, J.E., Johnston, D.A., Rollinson, D. (2011). Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites & Vectors* 4, 131.
- Le, T.H., Blair, D., Agatsuma, T., Humair, P.F., Campbell, N.J.H., Iwagami, M., Littlewood, D.T.J., Peacock, B., Johnston, D.A., Bartley, J., Rollinson, D., Herniou,

- E.A., Zarlenga, D.S., McManus, D.P. (2000). Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders - a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1123-1125.
- Lenzi, H.L., Jurberg, A.D., Coelho, P.M.Z., Lenzi, J.A. (2008). Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* do hospedeiro definitivo. In Carvalho, O.S., Coelho, P.M.Z., Lenzi, H.L. (Orgs), *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar (pp. 87-145). Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz.
- Lindholz, C.G., Favero, V., Verissimo, C.M., Candido, R.R.F., de Souza, R.P., dos Santos, R.R., Morassutti, A.L., Bittencourt, H.R., Jones, M.K., St. Pierre, T., Graeff-Teixeira, C. (2018). Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(3), e0006274. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.
- Littlewood, D.T.J., Lockyer, A.E., Webster, B.L., Johnston, D.A., Le, T.H. (2006). The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Molecular Phylogenetics Evolution* 39, 452-467.
- Lockyer, A.E., Olson, P.D., Ostergaard, P., Rollinson, D., Johnston, D.A., Attwood, S.W., Southgate, V.R., Horak, P., Snyder, S.D., Le, T.H., Agatsuma, T., Mcmanus, D.P., Carmichael, A.C., Naem, S., Littlewood, D.T. (2003). The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology* 126, 203- 224.
- McManus, D.P., Dunne, D.W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennerval, B., Zhou, X.N. (2018). Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4:13.
- McManus, D.P., Hope, M. (1993). Molecular variation in the human schistosomes. *Acta Tropica* 53, 255-76.
- McKerrow J.J. (2003). Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends in Parasitology* 19(2), 66-68.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2018). Educação em saúde para o controle da esquistossomose. Brasília, Distrito Federal.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. (2017). Guia de Vigilância em Saúde. Brasília, Distrito Federal.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2013). Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011–2015. Brasília, DF.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2014) Vigilância da Esquistossomose mansoni, diretrizes técnicas. Brasília, Distrito Federal.

Morgan, J.A., DeJong, R.J., Adeoye, G.O., Ansa, E.D., Barbosa, C., Brémond, P., Cesari, I.M., Charbonnel, N., Corrêa, L.R., Coulibaly, G., D'andrea, O.S., Souza, C.P., Doenhoff, M.J., File, S., Idris, M.A., Incani, R.N., Jarne, P., Karanja, D.M.S., Kazibwe, F. (2005). Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology* 14, 3889-3902. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02709.x.

Morgan, J.A., DeJong, R.J., Kazibwe, F., Mkoji, G.M., Loker, E.S. (2003). A newly identified lineage of *Schistosoma*. *International Journal for Parasitology* 33, 977-985.

Oliveira, W.J., Magalhães, F.C., Elias, M.A.S., Castro, V.N., Favero, V., Lindholz, C.G., Oliveira, A.A., Barbosa, F.S., Gil, F., Gomes, M.A., Graeff-Teixeira, C., Enk, M.J., Coelho, P.M.Z., Carneiro, M., Negrão-Corrêa, D.A., Geiger, S.M. (2018). Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(2): e0006232. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.

Pan-American Health Organization. Epidemiological profiles of neglected diseases and other infections related to poverty in Latin America and the Caribbean. (2009) Recuperado de <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2009/nds-epi-profiles.pdf>.

Park, J.K., Kim, K.H., Kang, S.H., Kim, J.H., Eom, K.S., Littlewood, D.T.J. (2007). A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evolutionary Biology* 7, 11.

Peralta, J.M., Cavalcanti, M.G. (2018). Is POCCCA a truly reliable test for schistosomiasis diagnosis in low endemic areas? The trace results controversy. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(11), e0006813. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006813

Polman, K., Engels, D., Fayers, L., Deelder, A.M., Gryseels, B. (1998). Day-to-day fluctuation of schistosome circulating antigen levels in serum and urine of humans infected with *Schistosoma mansoni* in Burundi. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59 (1), 150-154.

Rey L. (2001). *Parasitologia*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara.

Rozas, J., Librado, P., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2010). DnaSP version 5.10.1. Barcelona, Espanha.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.

Sandoval, N., Siled-Lucas, M., Lopes, A.J., Perez-Arellano, J.L., Garaté, T., Muro, A. (2006). *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Experimental Parasitology* 114, 84-88.

Santorum, J.M., Darriba, D., Taboada, G.L., Posada, D. (2014). jmodeltest.org: selection of nucleotide substitution models on the cloud. *Bioinformatics*

Phylogenetics Applications Note 30 (9) 1310-1311
doi:10.1093/bioinformatics/btu032.

Short, R.B., Grossman, A.I. (1981). Conventional geimsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. *Journal of Parasitology* 67, 661-67.

Silva, J.R.M., Neves, R.H., & Gomes, D.C. (2008). Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In Carvalho, O.S., Coelho, P.M.Z. & Lenzi, H.L. (Orgs.), *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar (pp. 43-84). Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz.

Simpson, A.J.G., Dame, J.B., Lewis, F.A., McCutchan, T.F. (1984). The arrangement of ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni* - Identification of polymorphic structural variants. *European Journal of Biochemistry* 139, 41-5.

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical: Helmintex é o método de referência para comparação de desempenho com outros (05/2018) Recuperado de <http://www.sbmt.org.br/portal/helmintex-e-o-metodo-de-referencia-para-comparacao-de-desempenho-com-outros-diz-dr-carlos-graeff-teixeira/>

Stothard, J.R., Webster, B.L., Weber, T., Nyakaana, S., Webster, J.P., Kazibwe, F., Kabatereine, N.B., Rollinson, D. (2009). Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni* in Uganda: DNA barcoding reveals substantial genetic diversity within Lake Albert and Lake Victoria populations. *Parasitology*, 136, 1813-1824.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

Teixeira, C.F., Neuhauss, 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 Neglected Tropical Diseases* 1(2): e73. doi:10.1371/journal.pntd.0000073.

Tsang, V.C., Hancock, K., Maddison, S.E., Beatty, A.L., Moss, D.M. (1984). Demonstration of species-specific and cross-reactive components of the adult microsomal antigens from *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* (MAMA and JAMA). *Journal Immunology*, 132(5), 2607-2613.

Tsang, V.C., Tsang, K.R., Hancock, K., Kelly, M.A., Wilson, B.C., Maddison, S.E. (1983). *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. *Journal Immunology*, 130(3), 1359-1365.

Valadares, T.E., Coelho, P.M.Z., Pellegrino, J., Sampaio, I.B.M. (1981). *Schistosoma mansoni*: Comparação da oviposição entre as cepas LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) e ST (Libéria) em camundongos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 23, 1-5.

Van Dam, G.I., Wichers, J.H., Ferreira, T.M.F., Ghati, D., Van Amerongen, A., Deelder, A.M. (2004). Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5458-5461.

Van Lieshout, L., De Jonge, N., Mansour, M.M., Bassily, S., Krijger, F.W., Deelder, A.M. (1993). Circulating cathodic antigen levels in serum and urine of schistosomiasis patients before and after chemotherapy with praziquantel. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 311-312.

Van Lieshout, L., Polderman, A.M., Deelder, A.M. (2000). Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA e CCA, in individuals with recent or light infections. *Acta Tropica* 77, 69-80.

Van 'T Wout, A.B., De Jonge, N., Tiu, W.U., Garcia, E.E., Mitchell, G.F., Deelder, A.M. (1992). Schistosome circulating anodic antigen in serum of individuals infected with *Schistosoma japonicum* from the Philippines before and after chemotherapy with praziquantel. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 410-413.

Warren, K.S. (1967). A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice: penetration of cercariae maturation of schistosomes and production of liver disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 795-802.

Webster, B.L., Diaw, O.T., Seye, M.M., Webster, J.P., Rollinson, D. (2013). Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: species barrier break down between ruminant and human schistosomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2110.

Webster, B.L., Emery, A.M., Webster, J.P., Gouvras, A., Garba, A., Diaw, O., Seye, M.M., Tchuenté, L.A.T., Simoonga, C., Mwanga, J., Lange, C., Kariuki, C., Mohammed, K.A., Stothard, J.R., Rollinson, D. (2012). Genetic diversity within *Schistosoma haematobium*: DNA barcoding reveals two distinct groups. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1882.

Webster, B.L., Littlewood, D.T.J. (2012). Mitochondrial gene order change in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea: Schistosomatidae). *International Journal for Parasitology* 42, 313-321.

Webster, B.L., Rabone, M., Pennance, T., Emery, A.M., Allan, F., Gouvras, A., Knopp, S., Hamidou, A.A., Mohammed, K.A., Ame, S.M., Rollinson, D., Webster, J.P. (2015). Development of novel multiplex microsatellite polymerase chain reactions to enable high-throughput population genetic studies of *Schistosoma haematobium*. *Parasit Vectors*, 8, 432. doi.org/10.1186/s13071-015-1044-6.

Webster, B.L., Webster, J.P., Gouvras, A.N., Garba, A., Lamine, M.S., Diaw, O.T., Seye, M.M., Tchuenté, L.A., Simoonga, C., Mubila, L., Mwanga, J.R., Lwambo, N.J., Kabatereine, N.B., Lange, C.N., Kariuki, C., Mkoji, G.M., Rollinson, D., Stothard, J.R. (2013). DNA 'barcoding' of *Schistosoma mansoni* across sub-Saharan Africa supports substantial within locality diversity and geographical separation of genotypes. *Acta Tropica*, 128, 250-260.

Weerakoon, K.G.A.D., Gobert, G.N., Cai, P., McManus, D.P. (2015). Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 28.

World Health Organization. (2018). Schistosomiasis: Infection and transmission. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.

World Health Organization. (2016). Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. *Weekly epidemiological record* 91:53–60. Recuperado de <http://apps.who.int/iris/handle/10665/254287>.

World Health Organization. (2013). *Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020*. Geneva, Switzerland.

Capítulo I

RESEARCH ARTICLE

Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil

Catiell Gobetti Lindholz¹, Vivian Favero¹, Carolina de Marco Verissimo^{1,2}, Renata Russo Frasca Candido³, Renata Perotto de Souza¹, Renata Rosa dos Santos¹, Alessandra Loureiro Morassutti¹, Helio Radke Bittencourt⁴, Malcolm K. Jones⁵, Timothy G. St. Pierre³, Carlos Graeff-Teixeira^{1*}

1 Laboratório de Biologia Parasitária, School of Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, **2** School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland, **3** School of Physics, The University of Western Australia, Crawley, Western Australia, Australia, **4** Polytechnic School, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, **5** School of Veterinary Science, The University of Queensland, Queensland, Australia

* graeff.teixeira@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Lindholz CG, Favero V, Verissimo CdM, Candido RRF, de Souza RP, dos Santos RR, et al. (2018) Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 12(3): e0006274. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274>

Editor: Poppy H. L. Lamberton, Imperial College London, UNITED KINGDOM

Received: August 10, 2017

Accepted: January 26, 2018

Published: March 8, 2018

Copyright: © 2018 Lindholz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Financial support (PVE 401904/2013-0) was provided by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Brasil (CNPq: www.cnpq.br), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: www.capes.gov.br) *Auxílio-PE-

Abstract

Control initiatives have successfully reduced the prevalence and intensity of schistosomiasis transmission in several localities around the world. However, individuals that release low numbers of eggs in their feces may not be detected by classical methods that are limited by low sensitivity. Given that accurate estimates of prevalence are key to implementing planning control actions for the elimination of schistosomiasis, new diagnostic tools are needed to effectively monitor infections and confirm transmission interruption. The World Health Organization recommends the Kato-Katz (KK) thick smear as a parasitological test for epidemiological surveys, even though this method has been demonstrated to underestimate prevalence when egg burdens are low. The point-of-care immunodiagnostic for detecting schistosome cathodic circulating antigen (POC-CCA) method has been proposed as a more sensitive substitute for KK in prevalence estimations. An alternative diagnostic, the Helmintex (HTX) method, isolates eggs from fecal samples with the use of paramagnetic particles in a magnetic field. Here, a population-based study involving 461 individuals from Candeal, Sergipe State, Brazil, was conducted to evaluate these three methods comparatively by latent class analysis (LCA). The prevalence of schistosomiasis mansoni was determined to be 71% with POC-CCA, 40% with HTX and 11% with KK. Most of the egg burdens of the individuals tested (70%) were < 1 epg, thereby revealing a dissociation between prevalence and intensity in this locality. Therefore, the present results confirm that the HTX method is a highly sensitive egg detection procedure and support its use as a reference method for diagnosing intestinal schistosomiasis and for comparative evaluation of other tests.

Parasitologia 1427/2011/Edital 32". C.Graeff-Teixeira is a recipient of a CNPq PQ 1D fellowship and grants (307005/2014-3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: C.Graeff-Teixeira has a patent deposited in Brazil for the method Helmintex.

Author summary

Schistosomiasis is a parasitic infection that is caused by flatworms that live inside venous vessels. The parasite eggs are eliminated with human feces. They hatch in the water and the free swimming larvae infect snails. The larvae develop in the snail tissues and, on reaching an infective stage, are released into the water and can penetrate human skin to restart the cycle. Millions of people on several continents have schistosomiasis, although sanitary improvements, treatment, and environmental control have reduced the intensity of transmission in various localities around the world. In order to eliminate schistosomiasis, identification of infected individuals is critical. However, in areas where transmission has declined, the methods used to detect eggs in human feces are not sufficiently sensitive. Therefore, the aim of the present study was to evaluate new and more sensitive methods for obtaining a diagnosis of schistosomiasis. This study compared the relative performance of the POC-CCA method, which detects parasite molecules released in urine and the Helmintex (HTX) method, which isolates eggs from large volumes of feces in a magnetic particle-based assay, together with the Kato-Katz method. In comparison with the egg detecting methods (Kato-Katz [KK] and HTX), the POC-CCA method exhibited limitations in detecting low intensity infections, while the HTX method was confirmed to be a highly sensitive diagnostic method for schistosomiasis. These results provide insights into the deployment of diagnostic tools for efforts to eliminate schistosomiasis in low endemic regions.

Introduction

Schistosomiasis is a common infection that affects over 290 million individuals, especially in Sub-Saharan Africa, Asia, and South America [1]. In Brazil, the sole agent of schistosomiasis is *Schistosoma mansoni*, responsible for intestinal schistosomiasis. This species is endemic to northeastern and southeastern regions in Brazil, although focal transmission sites have been reported in other regions [2].

It is challenging to diagnose schistosomiasis in areas of low endemicity where prevalence and worm burden have decreased [3]. Classical diagnostic methods lack sensitivity in populations where effective control measures have reduced transmission or in areas where the parasite has recently been introduced [4,5]. Detection methods that employ antibodies [6], antigens [7], or DNA [8] have exhibited high sensitivity but reduced specificity compared to microscopy-based assays [9] and they are semi-quantitative [10]. The Kato-Katz (KK) fecal smear method [11] is recommended by the World Health Organization for routine use in epidemiological surveys as part of control measures in endemic areas [12]. The KK method has exhibited good performance in high endemic areas and is still applied in diagnostic surveys due to its ease of application and specificity. However, KK is not an accurate diagnostic in many situations, for example in situations where part of a population has been previously treated and low egg burden is present in stool [13]. In addition, because the volume of stool needed for the KK method is very small (< 50 mg), and eggs may be unevenly distributed in feces [14,15], a large fraction of true positives may be missed with the KK method [13].

To address these limitations, the Helmintex (HTX) method was developed [16] to specifically detect light infections. The HTX method is based on interactions between *S. mansoni* eggs and superparamagnetic particles in a magnetic field. Seeding experiments have demonstrated 100% sensitivity with this method for egg burdens higher than 1.3 epg [16]. Biophysical

properties of the egg surface that may contribute to the performance of the HTX method have also been extensively studied [17,18]. Furthermore, Favero et al. [19] recently proposed an optimization of the HTX method that makes it less time consuming and more efficient for field surveys.

A point-of-care immunodiagnostic for detecting schistosome cathodic circulating antigen in urine (POC-CCA method) has been proposed as a substitute for the KK method based on its estimated higher sensitivity and operational advantages, especially in highly endemic areas. However, even with the advantages of the POC-CCA method, there is still a need for a highly sensitive and direct method for detecting eggs that can serve as a reference in performance evaluations. Other direct diagnostic methods, like biopsy, are not feasible for population-based studies. Antigen detection methods, like POC-CCA, may indicate the presence of worms that are not excreting eggs at that time, but further studies are required for extensive evaluation of its specificity. Thus, the aim of the present study was to compare by latent class analysis the performances of the HTX, KK, and POC-CCA methods in an endemic area for schistosomiasis in northeastern Brazil and to evaluate the following hypotheses: i) highly sensitive methods can be evaluated in medium-high endemic areas rather than in low endemic areas if they include large numbers of low intensity infections and ii) the HTX method has the capacity to serve as a reference egg detection method due to its high sensitivity.

Materials and methods

Area of study and population

Between October and November 2015, a prospective community- and geographically-based study was conducted in the locality of Candéal, Municipality of Estancia, State of Sergipe, Northeastern Brazil (11° 16' 04" S 37° 26' 16" W). Approximately 700 people live in Candéal, a restricted area with houses in close proximity that is well delineated by a federal highway (BR-101) on its west side, a stream to the south, and farms on its northern and eastern borders. Schistosomiasis morbidity was not addressed. Routine yearly fecal convenience sampling and examination by KK (but with poor coverage) is followed by treatment provided by local health service.

Ethical issues

A total of 580 individuals living in Candéal provided written informed consent to participate in this study. For the children and teenagers included in this study (aged 1–17 years), consent was provided by their parents or legal guardian. The protocol for this study was approved by the PUCRS Ethics Committee (register 48809715.1.0000.5336).

Sample collection and examination protocols

Study design and reporting follow the Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy (STARD-2015: <http://www.stard-statement.org/>) (S1 Checklist and S1 Flow Diagram).

Fecal samples

Each individual received a large container (1 L) and was directed to collect an entire evacuation. Feces were processed immediately upon their arrival in the laboratory.

A commercial KK kit (HelmTest, Biomanguinhos, Brazil) was employed for the preparation of slides with fecal smears, according to the manufacturer's instructions. Briefly, each sample was placed on a paper, then a metal mesh was pressed over it. The sieved feces were then scraped into a plastic circular template mounted on a glass slide so that the template was filled.

After removing the template, cellophane coverslips presoaked in a glycerin-malachite green solution were placed over the sieved feces. Two slides of each sample were prepared, labeled, and vertically stored in plastic boxes to ensure that no contact occurred between the slides. The boxes were kept in a refrigerator until they were examined by light microscopy. Each slide was completely screened by optical microscopy at a final magnification of 100× for the identification and quantitation of *S. mansoni* eggs. Egg per gram (egg-KK) values were calculated based on the average number of eggs counted on two slides, and multiplied by 24.

The HTX method was performed as previously described by Favero et al. [19] (Fig 1). Briefly, 30 g of feces was dissolved and fixed in a 10% Tween-20/70% ethanol solution (v/v). After 30 min, each suspension was passed through a 500 μm metal mesh, transferred to a conical flask, and washed until a clear supernatant was obtained. The suspension was then successively sieved through metal meshes with openings of 150 μm and 45 μm , respectively. The fraction retained by the last sieve was suspended in a 30% (v/v) ethyl acetate aqueous solution, homogenized and centrifuged for 10 min. at 200 $\times g$. The pellet was collected after discarding the debris ring at the top of the aqueous phase (a modified Ritchie method) [20]. Each pellet was transferred to a microtube containing 19 μL of iron oxide paramagnetic particles (Bangs Labs, USA). After the pellets and particles were allowed to homogenize for 30 min with orbital rotation, the microtubes were placed in a magnetic rack (Bangs Labs, USA) for 3 min. Unbound material was discarded before each tube was removed from the rack. The magnetic-responsive pellets were then resuspended in 100 μL of 0.9% aqueous NaCl solution (w/v) and stored at -4°C until analyzed. To prepare the samples for microscopy analysis, each sediment was suspended and stained in 3% ninhydrin (Sigma-Aldrich, USA) in 70% ethanol (v/v) and homogenized by pipetting. Each suspension was evenly spread over 5 cm \times 2.5 cm filter papers (24- μm pore) (UNIFIL, Brazil), identified, and kept for examination by optical microscopy

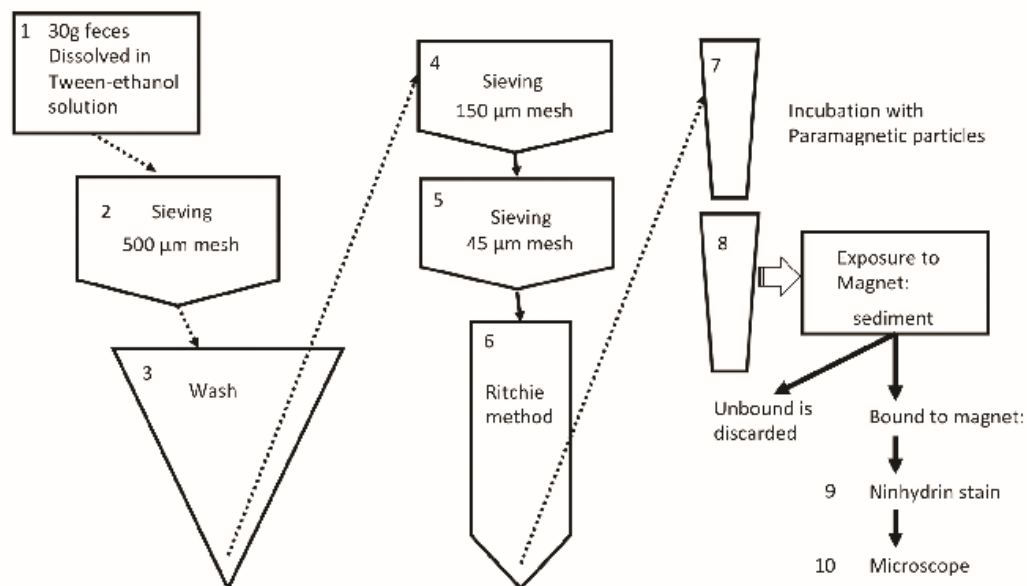


Fig 1. Schematic illustration of procedures in Helminex method. It includes concentration steps from 1 to 8, followed by detection steps (9 and 10): ninhydrin staining and microscopic examination.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.g001>

(magnification, 100×). At the time of microscopy, the filters were moistened with drops of 70% ethanol (v/v) before the total number of eggs present were counted. The filters were stored separately in paper envelopes to avoid cross-contamination between samples. The sum of the eggs detected on all of the filter papers was divided by 30 to express the number of egg of feces. Throughout the text “egg” is meant to be the egg burden estimated by HTX.

Urine samples

Each participant received a 200 mL container for urine collection. From each sample, 4 mL of urine was aliquoted and stored at -20°C for subsequent analyses.

POC-CCA tests were performed according to the manufacturer's instructions (Rapid Medical Diagnosis, Pretoria, South Africa). Briefly, a drop of urine was placed in a cassette and then a drop of developing reagent was added. Each cassette was kept at room temperature and the presence of a control line and a test line was checked exactly 20 min after the application of each sample. The results were recorded and independently verified by three trained observers. These results were also recorded by a digital camera under identical exposure settings. These images were reviewed by the same three observers for classification of intensity of test bands according to criteria (weak, medium, strong) proposed by Silveira et al. [21]. For most samples, the three sets of observations were in agreement. When different scores were recorded for a sample, the predicted infection status of the samples was reviewed by all three observers. If this review could not resolve the status, the final result was determined based on the observations of two of the three observers. “Trace” was considered a faint line with at least part of its limits not defined or absent. The instructions of the manufacturer states that “positivity” is any color that develops at the expected test site, but we register the result “trace” as defined above to allow a detailed comparative evaluation of the diagnostic methods, as previously reported by other authors [21, 22, 23].

Blood samples

Venous blood was collected. Serum was stored at -20°C for transportation and then was stored at -80°C at the laboratory for future serological studies. No adverse effects were reported after collection of any biological samples.

KK and HTX egg detection

The rationale for KK and HTX test positivity is that identification of an egg is pathognomonic for infection. Eggs of *S.mansoni* were identified using criteria as described by Favero et al. [19]. Performers and readers were blinded to other tests results or any clinical/epidemiological information.

Statistical analysis

Assuming no diagnostic test is a “gold-standard”, relative diagnostic performance was assessed by latent class analysis (LCA) for each of the tests conducted based on sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy of the tests. Latent class models estimate prevalence and diagnostic accuracy based on the observed data from different tests. It is assumed that 2 latent classes correspond to groups of truly infected and non-infected individuals [24]. The 461 qualitative results from KK, POC-CCA and HTX methods were starting data points for LCA available in R software, Package e1071 (<https://cran.r-project.org>, assessed on November 4, 2017).

Classification as “false-positive” or “false-negative” was based mainly on the estimates from LCA but it should not be taken as definitive since in the present study neither irregular daily

Table 1. A comparison of Kato-Katz (KK) and Helmintex (HTX) diagnostic methods that were applied to samples collected from the community of Candéal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015 (n = 461).

	HTX positive	(%)	HTX negative	(%)	Total	(%)
KK positive	54	(11.7)	1	(0.2)	55	(11.9)
KK negative	133	(28.9)	273	(59.2)	406	(88.1)
Total	187	(40.6)	274	(59.4)	461	(100.0)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t001>

egg elimination in feces (false-negative results from egg-detecting tests, KK and HTX) nor laboratory cross-contamination (HTX false-positive results) could be ruled out.

The Fisher exact test was used to compare the proportions of positive results obtained from KK, HTX and POC-CCA. The Cohen's Kappa coefficient was used to evaluate the agreement between the methods. The Student's t-test, ANOVA and Tukey's test were used to compare the means of epg in each category of POC-CCA band intensity.

Results

The HTX method is more sensitive than the KK method, while the POC-CCA method produced divergent results

A total of 681 individuals from Candéal, Brazil agreed to submit at least one type of biological sample for analysis in this study. A total of 461 (68%) participants donated feces, blood, and urine samples. Age groups comprised of 49 (10.7%) individuals less than 7 years-old, 92 (20%) school-aged-children (7 to 14 years-old) and 319 (69.3%) teenagers and adults. In order to compare all three methods, only results from those participants who provided all three specimens were examined (Tables 1–5 and S1 Table).

The results obtained from analyzing the fecal samples with the HTX and KK methods, and analyzing the urine samples with the POC-CCA method, are compared in Tables 1–5. The prevalence estimates that were obtained varied according to the method used. For example, a total of 187 (40.6%) and 55 (11.9%) samples were positive for *S. mansoni* eggs according to the HTX and KK methods, respectively (S2 Table). When the samples were analyzed with the POC-CCA method, 330 (71.6%) and 187 (40.6%) samples were positive for schistosomiasis when trace results were considered positive rather than negative, respectively (Tables 2–5).

The relative diagnostic performance of the tests was estimated by LCA and the resulting values are presented in Table 6. The KK and HTX methods were in agreement regarding 54 (11.7%) positive samples and 273 (59.2%) negative samples. However, in 133 (28.9%) samples, schistosomiasis was only diagnosed by the HTX method (kappa coefficient = 0.329).

The urine samples were analyzed with a POC-CCA kit and the results were recorded in two different ways (Tables 2–5). If “trace” results were treated as positive, as recommended by the POC-CCA kit manufacturer, 34 (7.4%) and 8 (1.7%) individuals that were diagnosed as positive for *S. mansoni* infection by the HTX and KK methods, respectively, would be incorrectly

Table 2. A comparison of point-of-care cathodic circulating antigen detection in urine (POC-CCA) and Kato-Katz (KK) diagnostic methods that were applied to samples collected from the community of Candéal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015 (n = 461). For this analysis, POC-CCA resulting in a faint line with at least part of its limits not defined or absent (“trace”) was considered a positive result.

	POC-CCA positive	(%)	POC-CCA negative	(%)	Total	(%)
KK positive	47	(10.2)	8	(1.7)	55	(11.9)
KK negative	283	(61.4)	123	(26.7)	406	(88.1)
Total	330	(71.6)	131	(28.4)	461	(100.0)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t002>

Table 3. A comparison of point-of-care cathodic circulating antigen detection in urine (POC-CCA) and Helmintex (HTX) diagnostic methods that were applied to samples collected from the community of Candeal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015 (n = 461). For this analysis, POC-CCA resulting in a faint line with at least part of its limits not defined or absent ("trace") was considered a positive result.

	POC-CCA positive	(%)	POC-CCA negative	(%)	Total	(%)
HTX positive	153	(33.2)	34	(7.4)	187	(40.6)
HTX negative	177	(38.4)	97	(21.0)	274	(59.4)
Total	330	(71.6)	131	(28.4)	461	(100.0)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t003>

classified as negative by the POC-CCA method. In contrast, when a comparison was made of the POC-CCA data with the examination of 187 samples with egg detected by HTX, 177 (38.4%) and 283 (61.4%) individuals would have false-positive results, respectively. In the subsets of samples containing < 1 epg or ≥ 1 epg, the POC-CCA method produced the lowest proportion of true-positive results (44% vs. 88%, respectively) and the highest proportion of false-negative results (24% vs. 3%, respectively) (Table 7)

Values for the estimated prevalence of schistosomiasis in the Candeal community differed widely according to the method used to diagnose the infection

The estimates of schistosomiasis prevalence varied from 11.9% (KK) to 71.6% (POC-CCA, with "trace" considered positive). The prevalences estimated from examining KK-slide1 and KK-slide2 were identical (8.7%), yet were lower than the prevalence estimate that was calculated when the results from slides 1 and 2 were combined (11.9%) (S3 Table). When prevalence estimates were analyzed by the HTX and POC-CCA methods (with the "trace" considered negative), the value was identical (40.6%), but Kappa coefficient was low (0.156) indicating poor agreement between these methods (Table 8).

The Candeal community includes a high prevalence of infected individuals with low egg burdens (low infection intensity)

The majority of the infected individuals examined presented low egg burdens. For example, among the 187 positive cases diagnosed by the HTX method, 131 (70%) cases involved < 1 epg (Fig 2). In contrast, 56 epg was the highest result obtained with the HTX method. When the epg numbers obtained for the samples with the HTX and KK methods were compared, 46 and 14 samples, respectively, had between 1 and 12 epg, while 23 samples had epg values > 50 .

Egg burden is estimated differently by the HTX and KK methods

Egg burdens estimated with the KK method were 2.1 to 720 times higher than those estimated with the HTX method in 96% of the samples, resulting in a correlation coefficient of 0.5615

Table 4. A comparison of point-of-care cathodic circulating antigen detection in urine (POC-CCA) and Kato-Katz (KK) diagnostic methods that were applied to samples collected from the community of Candeal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015 (n = 461). For this analysis, POC-CCA resulting in a faint line with at least part of its limits not defined or absent ("trace") was considered a negative result.

	POC-CCA positive	(%)	POC-CCA negative	(%)	Total	(%)
KK positive	40	(8.7)	15	(3.2)	55	(11.9)
KK negative	147	(31.9)	259	(56.2)	406	(88.1)
Total	187	(40.6)	274	(59.4)	461	(100.0)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t004>

Table 5. A comparison of point-of-care cathodic circulating antigen detection in urine (POC-CCA) and Helmintex (HTX) diagnostic methods that were applied to samples collected from the community of Candeal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015 (n = 461). For this analysis, POC-CCA resulting in a faint line with at least part of its limits not defined or absent ("trace") was considered a negative result.

	POC-CCA positive	(%)	POC-CCA negative	(%)	Total	(%)
HTX positive	107	(23.2)	80	(17.3)	187	(40.6)
HTX negative	80	(17.3)	194	(42.1)	274	(59.4)
Total	187	(40.6)	274	(59.4)	461	(100.0)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t005>

(Fig 3). Meanwhile, for only two samples the HTX method estimated 1.3- and 1.5-times higher epg values than KK (S1 Table).

POC-CCA band intensity partially correlates with egg burden when epg is equal or higher than 1

The average egg burden for POC-CCA band intensity categories were similar: 0.30 (strong), 0.33 (medium), and 0.26 (weak), in the epg <1 samples subset. Within the epg ≥ 1 group, there was an increase in the epg average from 3.37 (weak) to 11.61 (medium) and 14.70 (strong). The proportions of samples with strong reactivity have increased from 3.5% (epg <1) to 23.5% (epg ≥ 1), while those with weak reactivity decreased from 71.9% (epg <1) to 39.2% (epg ≥ 1) (Table 9).

An initial fecal mass less than the standard 30 g mass does not appear to influence HTX performance

Among the 461 fecal samples that were analyzed by the HTX method, only 7 samples had volumes less than the standard 30 g typically analyzed (25 g, 22 g, 20 g, 20 g, 12 g, 12 g, and 12 g). The number of eggs detected in these samples were 5, 4, 90, 3, 10, 24, and 1, respectively; which corresponds to epg estimates of 0.1, 0.13, 3, 0.1, 0.33, 0.8, and 0.03, respectively. In this

Table 6. Comparisons of the estimated sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy values after latent class analysis comparing Kato-Katz (KK) and Helmintex (HTX) methods and point-of-care immunodiagnostic for detecting *Schistosoma* cathodic circulating antigen method (POC-CCA) in samples from Candeal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015.

Parameters evaluated	KK % (95% CI)	HTX % (95% CI)	POC-CCA t-ve (*) % (95% CI)	POC-CCA t+ve (**) % (95% CI)
Sensitivity	29.3 (22.9–36.3)	100.0 (98.1–100.0)	57.4 (50.0–64.6)	81.9 (75.7–87.1)
Specificity	100.0 N/A (***)	100.0 (98.7–100.0)	71.1 (65.3–76.4)	35.5 (29.9–41.5)
PPV	100.0 N/A	100.0 N/A	57.7 (52.2–63.1)	46.7 (43.9–49.4)
NPV	67.2 (65.2–69.2)	100.0 N/A	70.8 (66.9–74.4)	74.0 (66.9–80.1)
Accuracy	71.1 (67.0–75.3)	100.0 N/A	65.5 (61.2–69.8)	54.4 (49.9–59.0)
Prevalence	11.9 (9.0–14.9)	40.8 (36.3–45.4)	40.6 (36.1–45.0)	71.6 (67.5–75.7)

(*) POC-CCA t-ve refers to the results obtained with the POC-CCA method when the "Trace" results were considered negative

(**) POC-CCA t+ve refers to the results obtained with the POC-CCA method when the "Trace" results were considered positive.

(***) N/A, not available.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t006>

Table 7. Distribution of POC-CCA method results according to egg burden (epg <1 and ≥ 1) in 187 samples collected from Candéal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015.

Detection result	epg < 1	%	epg ≥ 1	%	Total	%
Positive	57	44.2 ^a	51	87.9 ^b	108	57.8
Negative	31	24.0 ^a	2	3.4 ^b	33	17.6
"Trace"	41	31.8 ^a	5	8.6 ^b	46	24.6
	129	100.0	58	100.0	187	100.0

POC-CCA, point-of-care immunodiagnostic for detecting schistosome cathodic circulating antigen; epg, egg per gram, as estimated by HTX.

(^{a, b}) Different letters in the same line indicate a significant difference between the two proportions at 0.01 level of significance by using Fisher Exact Test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t007>

group of samples, eggs were only detected by the KK method in one sample (the 12 epg sample). These results indicate that the HTX method performs well with fecal masses less than 30 g.

Discussion

Andrews [25] previously proposed that the sensitivity of egg-detecting methods increases with the volume of biological material that is examined. The HTX method is applied to 30 g of feces and was developed after observing that *S. mansoni* eggs could be isolated from feces based on their interactions with paramagnetic particles in a magnetic field [16]. Thus, rather than screening filtered fecal samples, as occurs with the KK method, the eggs that are present in a larger volume of feces can be concentrated into a smaller volume with the HTX method in order to be more easily screened by microscopy. In seeding experiments, HTX method was 100% sensitive with egg burdens higher than 1.3 epg [16]. HTX processing takes approximately 3h and its current estimated cost is US\$ 3 per sample (a single KK slide preparation costs US\$ 0.2 and POC-CCA costs US\$ 1). More recently, the HTX method has been improved by introducing a detergent (Tween 20) at the concentration step, and then staining the final sediment with ninhydrin prior to microscopic evaluation [19]. As a result, significantly less time is spent

Table 8. A comparison of the positive (1) and negative (0) results obtained when the KK, POC-CCA (CCA) (Trace considered as "positive" or "negative"), and HTX methods were applied to 461 samples were collected in Candéal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015.

KK	Positive (1) or Negative (0) results		Trace "positive"		Trace "negative"	
	CCA	HTX	Sum	%	Sum	%
+	+	+	47	10.2	40	8.7
+	+	-	0	0	0	0
+	-	-	1	0.2	1	0.2
+	-	+	7	1.5	14	3.0
-	-	-	97	21.0	194	42.0
-	-	+	26	5.6	65	14.1
-	+	+	107	23.2	68	14.8
-	+	-	176	38.2	79	17.1
			461	100	461	100

KK, Kato-Katz method; HTX, Helminex method; POC-CCA, point-of-care immunodiagnostic for detecting schistosome cathodic circulating antigen method.

Kappa coefficients: 0.329 (HTX versus KK); 0.156 (POC-CCA trace positive); 0.285 (POC-CCA trace negative).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t008>

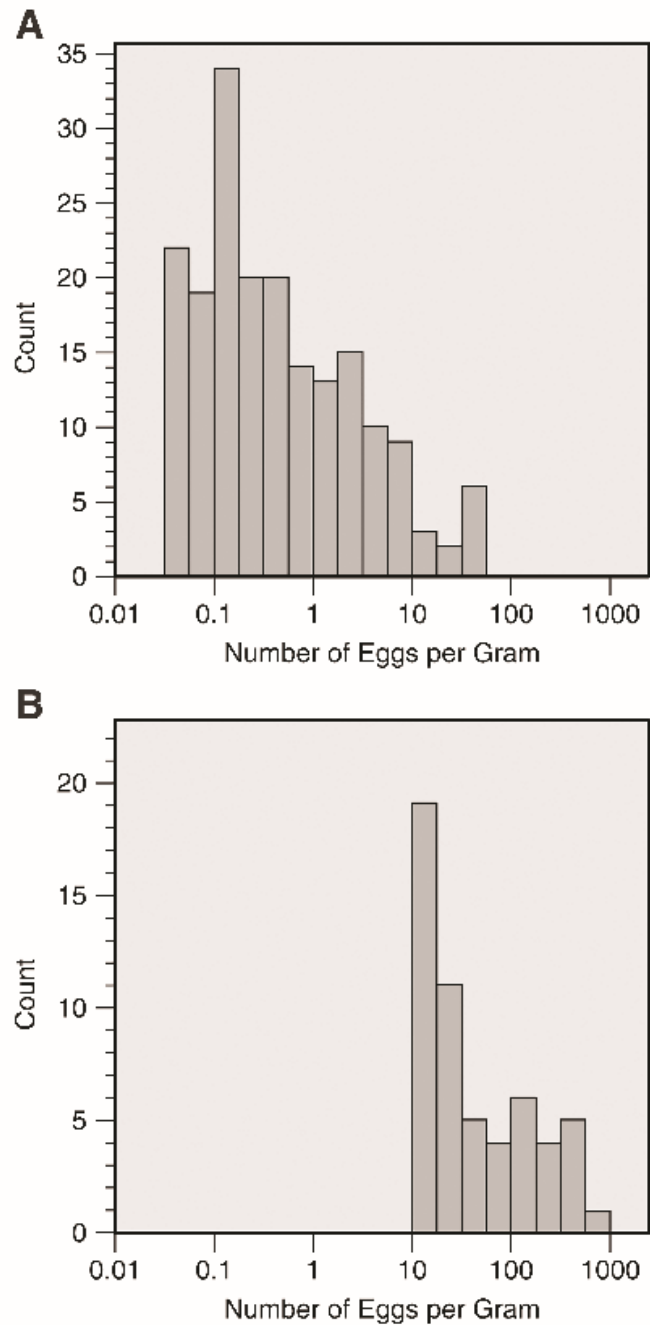


Fig 2. Egg counting by Helminex (HTX) and Kato-Katz (KK) methods. (A) Distribution of HTX-measured faecal egg burdens in the 187 subjects who tested positive and (B) distribution of the KK-measured faecal egg burdens in the 55 subjects who tested positive. Note the logarithmic scale on the horizontal axis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.g002>

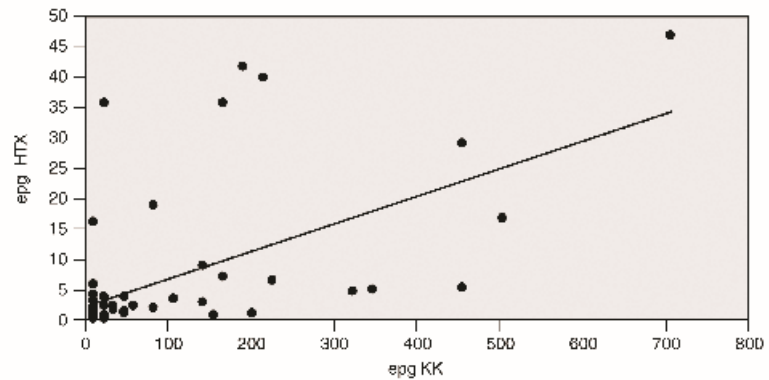


Fig 3. Case-to-case comparisons of the egg burden values estimated by the KK and HTX methods. Correlation coefficient is 0.5615 and 96% of the samples have higher epg values detected by the KK method.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.g003>

screening sediment samples, reducing the overall cost of the HTX method. However, it is also recognized that even with recent optimizations of the HTX procedure [19], the HTX method remains labor intensive and not applicable as a routine field diagnostic. Therefore, it is proposed that the HTX method should serve as a reference method for evaluating other methods.

The KK method is operationally simple and inexpensive, and is the diagnostic method recommended by the WHO for epidemiological studies [12]. However, this method lacks sensitivity when fewer eggs are present in a sample [13]. In a number of observational studies where “infected” and “non-infected” individuals were evaluated based on use of the KK method, false negatives probably occurred preventing a correct interpretation of the data [26]. In the present study, the HTX method exhibited higher sensitivity than the KK method. If this is confirmed in future studies, then the HTX method would represent the best method for obtaining a precise determination of infection status by egg detection. This determination is particularly critical for vaccine efficacy evaluations, individual clinical diagnoses, and control of cure efforts, especially in non-endemic countries [26,27,28].

Superior sensitivity of the HTX method compared with KK was previously demonstrated in field-based studies that were conducted in low endemic areas in Brazil [29,30]. In the present survey that was conducted in Candeal, Brazil, the HTX method detected eggs in 29% of the

Table 9. Distribution of POC-CCA method positive results according to egg burden (epg <1 and \geq 1) and intensity of the reaction in 108 samples collected from Candeal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015.

Intensity	epg < 1			epg \geq 1			Total	%
	n	%	Average	n	%	Average		
Strong	2	3.5	0.30 ^{aA}	12	23.5	14.70 ^{bB}	14	13.0
Medium	14	24.6	0.33 ^{aA}	19	37.3	11.61 ^{bAB}	33	30.5
Weak	41	71.9	0.26 ^{aA}	20	39.2	3.37 ^{bA}	61	56.5
	57	100.0		51	100.0		108	100.0

POC-CCA, point-of-care immunodiagnostic for detecting schistosome cathodic circulating antigen; epg, egg per gram.

^(a,b) Different letters in the same line indicate a significant difference between the two means at 0.05 level of significance by using t-test (equal variances not assumed).

^(A, B) Different letters in the same column indicate a significant difference between the means at 0.05 level by using post-hoc Tukey's test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.t009>

samples that were negative according to the KK method. In addition, the prevalence estimated by the HTX method was 3 times higher than the KK method (40% vs. 11%, respectively) (Table 1). The assessment of relative diagnostic performance by latent class analysis also clearly indicated that the HTX method provided high sensitivity and displayed an overall better performance (Table 6).

Egg burdens are predominantly low among infected individuals in the Candéal community, with 70% of them harboring less than 1 egg. It is noteworthy that low infection intensity is also associated with morbidity and should be targeted in late stages of schistosomiasis elimination [31]. This locality has been under surveillance and regular treatment for many years by the local Ministry of Health authorities. As a result, a high-prevalence, yet low infection-intensity profile has developed in the community. This is in contrast with the more typical coupling of high prevalence and intensity of infections. The potential for prevalence and intensity of infections to be dissociated should be considered in future epidemiological studies and should be used to adjust control measures appropriately. In addition, classification of endemicity needs to account for both prevalence and intensity [3].

With the exception of two samples, egg burdens were found to be higher with the KK method than with the HTX method (Fig 3). While both methods include concentration steps (sieving-KK and HTX; isolation with magnetic particles-HTX; see Fig 1), estimation of egg by the HTX method derives from absolute counting of eggs in 30 g of sample and the KK method estimates egg based on an extrapolation of egg counting in 42 mg of sample. Consequently, the latter potentially contributes to overestimated egg values. This interesting aspect is consistent with discussions in the field regarding the randomness of *S. mansoni* egg distribution in feces [14]. With the KK method only examining 42 mg of fecal samples, the possibility that eggs are unevenly distributed would become more evident when lower numbers of eggs are present. This was observed in the present study. It is also possible that HTX underestimates egg because of its estimated egg recovery of approximately 27% in seeding experiments [19].

POC-CCA is a rapid antigen-based detection test that is applied to urine samples. It has received increasing attention as a promising point-of-care field diagnostic tool, especially based on its use in high endemic areas (e.g., areas with high prevalence and intensity of infections). However, evaluations of this rapid test in low endemicity (specifically low intensity) areas is urgently needed [32,33,34]. The set of samples evaluated in the present study provided an opportunity to directly evaluate the performance of the POC-CCA method with predominantly low intensity infections in comparison with a very sensitive egg detection method (HTX). After LCA analysis, a higher probability of false-positive results is indicated by low positive predictive values (PPV = 46.7% when “trace” is considered positive) (Table 6). Variability in daily egg excretion may explain POC-CCA positive and egg-negative detection and this issue should be addressed in future studies together with appropriate protocol adjustments to minimize cross-contamination in order to avoid false-positive egg detection. Furthermore, performance of the POC-CCA method was worse in the subset of samples that contained less than 1 egg, with a lower detection of “true-positives” and a higher number of “false-positive” results observed (Table 7). Correlation of band intensity and egg burden is also poor, especially with samples containing less than 1 egg (Table 9). Thus, the limitations of the POC-CCA assay for diagnosis of schistosomiasis in individuals that eliminate low numbers of eggs in stool were demonstrated.

In conclusion, the results of the present study support the two initial hypotheses. First, medium-highly endemic areas (defined by prevalence) are suitable for evaluating the diagnostics performance of egg detection methods if a large number of low intensity infections are present, as is the case in Candéal. Thus, “low endemicity areas” with low numbers of positive samples should be avoided when evaluating detection methods. Second, the HTX method is

very sensitive and should be used as a reference method for diagnosing intestinal schistosomiasis and for comparative evaluation of other tests. The HTX method should also be considered for use in the monitoring and certification of transmission interruption.

Supporting information

S1 Checklist. The STARD-2015 checklist.

(DOCX)

S1 Table. Data on 461 samples from Candéal, November 2015. All samples that had feces, urine and serum collected for the study and results from Kato-Katz, Helmintex and POC-CCA.

(XLSX)

S2 Table. Data on 187 samples from Candéal, November 2015. The samples where egg was detected by Helmintex and Kato Katz, and the results from POC-CCA examination.

(XLSX)

S3 Table. Data on 55 samples from Candéal, November 2015. Evaluation of positivity in each Kato-Katz slide.

(XLSX)

S1 Flow Diagram. STARD-2015.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank the community of Candéal and its leader, Fabio Givanildo da Cruz; the local School supervisor, Lucizete Silva. We also thank the Health Authorities and teams: Sergipe State officers (Sidney Sá and Alda Rodrigues); Municipality of Estancia: Marta Angélica, Fernanda Assunção, Camen Fontes, Roseane Ferreira and Orlando Nascimento Silva (epidemiology unit); Marcela Abreu Lima, Daniela Freitas, Aristânia Sobral, Renata Nascimento and Marlene Andrade, (Public Health Laboratory).

Author Contributions

Conceptualization: Catieli Gobetti Lindholz, Renata Russo Frasca Candido, Malcolm K. Jones, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Data curation: Catieli Gobetti Lindholz, Vivian Favero, Renata Russo Frasca Candido, Renata Perotto de Souza, Carlos Graeff-Teixeira.

Formal analysis: Catieli Gobetti Lindholz, Helio Radke Bittencourt, Malcolm K. Jones, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Funding acquisition: Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Investigation: Catieli Gobetti Lindholz, Vivian Favero, Renata Russo Frasca Candido, Renata Perotto de Souza, Renata Rosa dos Santos, Alessandra Loureiro Morassutti, Malcolm K. Jones, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Methodology: Catieli Gobetti Lindholz, Vivian Favero, Carolina de Marco Verissimo, Renata Russo Frasca Candido, Renata Perotto de Souza, Renata Rosa dos Santos, Alessandra Loureiro Morassutti, Malcolm K. Jones, Carlos Graeff-Teixeira.

Project administration: Catieli Gobetti Lindholz, Carolina de Marco Verissimo, Malcolm K. Jones, Carlos Graeff-Teixeira.

Resources: Carlos Graeff-Teixeira.

Supervision: Carolina de Marco Verissimo, Alessandra Loureiro Morassutti, Helio Radke Bittencourt, Malcolm K. Jones, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Validation: Catieli Gobetti Lindholz, Vivian Favero, Carolina de Marco Verissimo, Renata Russo Frasca Candido, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Visualization: Catieli Gobetti Lindholz, Vivian Favero, Carolina de Marco Verissimo, Renata Russo Frasca Candido, Renata Perotto de Souza, Renata Rosa dos Santos, Malcolm K. Jones, Carlos Graeff-Teixeira.

Writing – original draft: Catieli Gobetti Lindholz, Vivian Favero, Carolina de Marco Verissimo, Renata Russo Frasca Candido, Malcolm K. Jones, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

Writing – review & editing: Catieli Gobetti Lindholz, Alessandra Loureiro Morassutti, Helio Radke Bittencourt, Malcolm K. Jones, Timothy G. St. Pierre, Carlos Graeff-Teixeira.

References

1. WHO. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. *Wkly Epidemiol.* 2016; 91:53–60. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/254287>.
2. Zoni AC, Catalá L, Ault SK. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942–2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(3):e0004493. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004493> PMID: 27007193
3. WHO. Schistosomiasis Progress Report 2001–2011 and Strategic Plan 2012–2020. 2013. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>.
4. Haggag AA, Rabiee A, Elaziz KMA, Hay RA, Ramzy RMR. Mapping of *Schistosoma mansoni* in the Nile Delta, Egypt: Assessment of the prevalence by the circulating cathodic antigen urine assay. *Acta Tropica.* 2017;(167):9–17.
5. Kittur N, Castleman JD, Campbell CH Jr, King CH, Colley DG. Comparison of *Schistosoma mansoni* prevalence and intensity of infection, as determined by the Circulating Cathodic Antigen Urine Assay or by the Kato-Katz Fecal Assay: A Systematic Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94(3):605–610. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0725> PMID: 26755565
6. Doenhoff M, Chiodini P, Hamilton J. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends in Parasitology.* 2004; 20(1). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.019>
7. Deelder AM, Qian ZL, Kreamsner PG, Acosta L, Rabello AL, et al. Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. *Trop Geogr Med.* 1994; 46:233–238. PMID: 7825226
8. Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(2):157–162. PMID: 12135287
9. Koukounari A, Donnelly CA, Moustaki I, Tukahebwa EM, Kabatereine NB, et al. A latent Markov modeling approach to the evaluation of circulating cathodic antigen strips for schistosomiasis diagnosis pre- and post- praziquantel treatment in Uganda. *PLoS Comput Biol.* 2013; 9(12):e1003402. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003402> PMID: 24367250
10. Coulibaly JT, N'Gbesso YK, Knopp S, N'Guessan NA, Silue KD, et al. Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(3):e2109. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002109> PMID: 23556011
11. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1972; 14(6):397–400. PMID: 4675644
12. WHO. The control of schistosomiasis: report of a WHO expert committee. 1985. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39529/1/WHO_TRS_728.pdf.

13. De Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today*. 1992; 8(8):274–277. PMID: [15463638](#)
14. Krauth SJ, Coulibaly JT, Knopp S, Traoré M, N'Goran EK, Utzinger J. An in-depth analysis of a piece of shit: distribution of *Schistosoma mansoni* and hookworm eggs in human stool. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(12):e1969. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001969> PMID: [23285307](#)
15. Utzinger J, Booth M, N'Goran EK, Muller I, Tanner M, et al. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitology*. 2001; 122(Pt 5):537–544. PMID: [11393827](#)
16. Teixeira CF, Neuhauss E, Ben R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007; 1(2):e73. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000073> PMID: [18060086](#)
17. Karl S, Gutierrez L, Lucyk-Maurer R, Kerr R, Candido RR, et al. The iron distribution and magnetic properties of schistosome eggshells: implications for improved diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(5):e2219. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002219> PMID: [23696910](#)
18. Candido RR, Favero V, Duke M, Karl S, Gutierrez L, et al. The affinity of magnetic microspheres for *Schistosoma* eggs. *Int J Parasitol*. 2015; 45(1):43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.011> PMID: [25305086](#)
19. Favero V, Frasca Candido R, De Marco Verissimo C, Jones M, St. Pierre T, Lindholz CG, Da Silva V, et al. Optimization of the Helminx method for schistosomiasis diagnosis. *Experimental Parasitology*. 2017; 177:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.001> PMID: [28431921](#)
20. Ritchie L S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the United States Army Medical Department*. 1948; 8(4):326.
21. Silveira AMS, Costa EGD, Ray DR, Suzuki BM, Hsieh MH, Fraga LAO, Caffrey CR. Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(1):e0004357. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004357> PMID: [26752073](#)
22. Siqueira LMV, Couto FFB, Taboada D, Oliveira AA, Carneiro NFF, Oliveira E, Coelho PMZ, Katz N. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2016; 49(3):341–347. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0070-2016>. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0070-2016> PMID: [27384831](#)
23. Coelho PMZ, Siqueira LMV, Fortini R, Grenfel Q, Almeida NBF, Katz N, Almeida A, Carneiro NFF, Edward Oliveira. Improvement of POC-CCA Interpretation by using lyophilization of urine from patients with *Schistosoma mansoni* low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(6):e0004778. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004778> PMID: [27326453](#)
24. Smeden M, Naaktgeboren CA, Reitsma JB, Moons KGM, de Groot JAH. Latent Class Models in Diagnostic Studies When There is No Reference Standard—A Systematic Review. *Am J Epidemiol*. 2014; 179: 423–431. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt286> PMID: [24272278](#)
25. Andrews MN. The examination of faeces for the ova of *Schistosoma japonicum*. *Chinese Med. Journal*. 1935; 49:42–46.
26. Wajja A, Kizito D, Nassanga B, Nalwoga A, Kabagenyi J, Kimuda S, et al. The effect of current *Schistosoma mansoni* infection on the immunogenicity of a candidate TB vaccine, MVA85A, in BCG-vaccinated adolescents: An open-label trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(5):0005440.
27. Silveira-Lemos D, Costa-Silva MF, Silveira ACO, Batista MA, Oliveira-Fraga LA, Silveira AMS, Alvarez MCB, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A. Cytokine pattern of T lymphocytes in acute Schistosomiasis mansoni patients following treated praziquantel therapy. *Journal of Parasitol Res*. 2013;909134. <https://doi.org/10.1155/2013/909134> PMID: [23401741](#)
28. El-Aswada BDW, Doenhoff MJ, El Hadidid S, Schwaëblea WJ, Lynch NJ. Use of recombinant calreticulin and cercarial transformation fluid (CTF) in the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni*. *Immunobiology*. 2011; 216(3):379–385. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.06.014> PMID: [20691496](#)
29. Caldeira K, Teixeira CF, Silveira MB, Fries LC, Romanzini J. Comparison of the Kato-Katz and Helminx methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Parana, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(5):690–692. PMID: [22850963](#)
30. Pinheiro MC, Carneiro TR, Hanemann AL, Oliveira SM, Bezerra FS. The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic setting in the state of Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(7):873–876. PMID: [23147142](#)
31. King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminth infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*. 2005; 365(9470):1561–1569. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66457-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66457-4) PMID: [15866310](#)

32. Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tchuente LAT, N'Goran EK, Erko B, Karanja DMS, Kabaterine NB, van Lieshout L, Rathbun S. A five-country evaluation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Urine Assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88(3):426–432. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0639> PMID: 23339198
33. Kittur N, Castleman JD, Campbell CH Jr., King CH, Colley DH. Comparison of *Schistosoma mansoni* prevalence and intensity of infection, as determined by the Circulating Cathodic Antigen urine assay or by the Kat-Katz fecal assay: a systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94(3):605–610. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0725> PMID: 26755565
34. Ortu G, Ndayishimiye O, Clements M, Kayugi D, Campbell CH Jr., Lamine MS, Zivieri A, Soares-Magalhaes R, Binder S, King CH, Fenwick A, Colley DG, Jourdan PM. Countrywide reassessment of *Schistosoma mansoni* infection in Burundi using a Urine-Circulating Cathodic Antigen Rapid Test: informing the national control program. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 96(3):664–673. doi: [10.4269/ajtmh.16-0671](https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0671). PMID: 28115675

Capítulo II

Rascunho de manuscrito a ser submetido ao periódico *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, intitulado “**Evaluating an adult microsomal antigen (MAMA) to detect *Schistosoma mansoni* infections in a highly endemic area in Candeal, Sergipe (Brazil).**”

1. Introdução

A esquistossomose é uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo, afetando cerca de 240 milhões de pessoas em mais de 76 países. Outros 700 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção na África, Ásia e América do Sul (WHO, 2013). Considerando a distribuição geográfica da esquistossomose e das populações afetadas, esta infecção é listada como uma doença tropical negligenciada e está associada à pobreza e a locais de saneamento ausentes ou inadequados. No Brasil, o único agente da doença é o *Schistosoma mansoni*, responsável pela esquistossomose intestinal. Esta espécie é endêmica das regiões Nordeste e Sudeste do país, embora locais de transmissão focal tenham sido relatados em outras regiões (Zoni et al, 2016). Como resultado, o Brasil é considerado o país da América Latina com os maiores números em focos de transmissão (Calasans et al, 2018). Durante o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses, o Nordeste e o Sudeste do Brasil, foram as regiões que apresentaram as maiores taxas de positividade (1,27% e 2,35% respectivamente). No Norte, a taxa de positivos foi de 0,01%, no Centro-Oeste de 0,02% e no Sul de 0,0. Entretanto, ressalva-se que, em áreas de baixa endemicidade, onde os indivíduos infectados apresentam baixas cargas parasitárias, o método de Kato-Katz, aplicado na obtenção destas estimativas, subestima significativamente a prevalência real da infecção, pois somente 25 a 30% dos infectados são detectados (Katz, 2018), e, no Brasil, a grande maioria das áreas endêmicas pode ser classificada como de baixa endemicidade (abaixo de 10,0% com 2 lâminas de Kato-Katz).

Nos últimos anos, estratégias globais de controle da esquistossomose foram desenvolvidas utilizando, principalmente, quimioterapia massiva em áreas

endêmicas. Esta metodologia tem se mostrado útil na redução da morbidade, mas não na eliminação da infecção pelo *Schistosoma*. O resultado desta estratégia foi o aumento dos casos com baixa carga parasitária, dificultando o diagnóstico pelos métodos classicamente utilizados.

A detecção de ovos nas fezes é o método mais tradicional e específico para o diagnóstico da infecção pelo esquistossomo. Existem muitas variações de métodos parasitológicos. Atualmente, o método Helmintex (HTX) é o teste mais sensível aplicado em amostras humanas (Lindholz et al, 2018). Este método foi desenvolvido para aumentar a sensibilidade em métodos parasitológicos e, conseqüentemente, detectar especialmente infecções leves, abrangendo também o diagnóstico de infecções com média e alta cargas parasitárias (Teixeira et al, 2007). Este método é baseado em interações paramagnéticas entre ovos de *S. mansoni* e partículas superparamagnéticas em um campo magnético. Experimentos de semeadura demonstraram 100% de sensibilidade do método para cargas de ovos superiores a 1,3 OPG (Teixeira et al, 2007). Outros métodos diagnósticos têm sido comumente testados, visando a aplicação em estudos de campo e no diagnóstico clínico, tais como métodos de detecção que empregam antígenos (Smith et al, 2012), anticorpos (Doenhoff et al, 2004) ou DNA (Pontes et al, 2002), que exibem alta sensibilidade mas reduzida especificidade em comparação com ensaios baseados em microscopia (Hinz et al, 2017). Os antígenos microssomais de vermes adultos (MAMA) são considerados boas moléculas-alvo para o diagnóstico sorológico, devido à alta especificidade e baixas taxas de reatividade cruzada (Tsang et al, 1983), sendo destinados à promoção do diagnóstico espécie-específico nos casos de infecção ativa (Tsang et al, 1984).

Este estudo tem como objetivo analisar o desempenho do antígeno microssomal de vermes adultos (MAMA) através do método Western Blot (WB), no diagnóstico da esquistossomose mansônica, em amostras de soro humano de área endêmica no nordeste do Brasil, utilizando como parâmetro para confirmação da infecção os resultados determinados pelo método Helmintex.

2. Materiais e Métodos

Inquérito comunitário e considerações éticas: O estudo foi realizado na localidade Candéal, Município de Estância, Estado de Sergipe, Brasil. As amostras foram obtidas entre os meses de Outubro e Novembro de 2015. Um total de 138 indivíduos residentes na localidade Candéal assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar deste estudo. Foram incluídos como participantes os indivíduos maiores de um ano de idade, de maneira que para as crianças e adolescentes incluídos (com idade entre 1 e 17 anos), o Termo de Consentimento Informado foi obtido pelos pais ou responsáveis. A privacidade e a segurança dos participantes foram asseguradas, seguindo as normas e padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. O projeto foi aprovado e registrado sob o protocolo número 48809715.1.0000.5336.

Amostras de fezes: Uma amostra de fezes foi coletada por indivíduo. Cada participante recebeu um contêiner de 1 litro, e foi orientado a coletar uma evacuação completa. As amostras foram transportadas em caixas isolantes térmicas, e as fezes, processadas imediatamente após a chegada ao laboratório. O método HTX foi realizado conforme descrito por Favero et al. (2017). Foram utilizados 30 gramas de fezes dissolvidas e fixadas em solução de etanol a 10% Tween-20/70%. Após 30 min, a suspensão foi passada através de uma malha metálica com abertura de 500 μm . O material filtrado foi transferido para um frasco cônico, e lavado repetidamente até a obtenção de um sobrenadante límpido. A suspensão foi então sucessivamente peneirada através de malhas metálicas com aberturas de 150 μm e 45 μm , respectivamente, com a finalidade de reter os ovos do parasito. A fração retida na última peneira foi re-suspensa em uma solução de Acetato de Etila a 30% (v/v). Após homogeneização, a mistura foi centrifugada durante 10 min a 200 xg. O anel de resíduos no topo da fase aquosa (Ritchie, 1948) foi descartado e o pellet obtido foi transferido para um microtubo contendo 19 μL de partículas paramagnéticas de óxido de ferro (Bangs Labs, EUA). Esta mistura foi homogeneizada por 30 min com rotação orbital. Após, os microtubos foram colocados em um suporte magnético (Bangs Labs, EUA) durante 3 min. O material não aderido foi descartado antes dos tubos serem removidos do suporte magnético. Os sedimentos atraídos magneticamente foram ressuspensos em 100 μl de solução aquosa de NaCl a 0,9%

(p/v) e armazenados a 4°C até o momento da análise. Para a preparação das amostras para análise de microscopia, cada sedimento foi suspenso e corado solução de ninidrina 3% (Sigma-Aldrich, EUA) em etanol a 70% (v/v) e homogeneizado por pipetagem. As suspensões foram distribuídas uniformemente sobre papéis de filtro (UNIFIL, Brasil), identificados e analisados por microscopia óptica.

Amostras de sangue: Quatro mL de sangue venoso foram coletados de cada participante. As amostras foram centrifugadas imediatamente após a sua chegada no laboratório de campo. O soro foi armazenado a -20°C para transporte e após, conservado a -80°C no Laboratório de Parasitologia Molecular da PUCRS.

Diagnóstico sorológico de infecções pelo *Schistosoma mansoni* utilizando o método Western Blot: A análise sorológica das amostras foi realizada no Laboratório de Parasitologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em Porto Alegre, Brasil. A reação de anticorpos à infecção pelo *S. mansoni* foi detectada pelo método Western Blot, utilizando antígeno microssomal de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (MAMA). As membranas impregnadas com antígeno MAMA foram produzidas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em Atlanta, Geórgia, EUA utilizando protocolos estabelecidos por Tsang e colaboradores (1983; 1984), obtidas de acordo com colaboração previamente estabelecida entre ambas instituições.

As amostras de soro foram diluídas em PBS-0,3% Tween/5% Milk Buffer, resultando numa diluição sérica final de 1:100. Os resultados foram determinados pela visualização direta das reações nas membranas com antígeno MAMA (30 kD), coradas com 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB). Como controle positivo foram utilizadas duas amostras de soro humano de pacientes infectados, previamente identificados com alta carga parasitária de acordo com o método Helmintex. As amostras de soro foram testadas em lotes, separados de acordo com resultados previamente demonstrados pelo método Helmintex (Lindholz et al, 2018). Para desenvolvimento das análises, as amostras de soro foram divididas em dois grupos: a) amostras com resultado negativo no exame parasitológico confirmatório

Helmintex, e b) amostras com resultado positivo no método Helmintex. Estas últimas foram ainda subdivididas em grupos de acordo com a carga parasitária apresentada (indivíduos com carga menor que 1 OPG e indivíduos com carga parasitária igual ou maior que 1 OPG). Foram calculadas as estimativas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia utilizando o Microsoft Office Excel, com as seguintes fórmulas: sensibilidade = $a/a+b$; especificidade = $d/c+a$; valor preditivo positivo = $a/a+c$; valor preditivo negativo = $d/b+d$; acurácia = $a+d/N$, onde:

- a) n° de amostras positivas em HTX e positivas no WB;
- b) n° de amostras positivas em HTX e negativas no WB;
- c) n° amostras negativas em HTX e positivas no WB;
- d) n° amostras negativas em HTX e negativas no WB;
- N) total de amostras do ensaio.

Os valores utilizados no cálculo de estimativa do intervalo de confiança foram extraídos da Tabela de Distribuição Normal Padrão (<http://www.pucrs.br/famat/viali/>).

3. Resultados

Um total de 138 amostras de soro foi analisado. Deste montante, 106 amostras (76,8%) foram positivas e 32 amostras (23,2%) demonstraram resultado negativo para infecção por *S. mansoni*. No total, foram reconhecidos 78 casos verdadeiramente positivos, 22 verdadeiramente negativos, 10 (11,4%) falso-negativos e 28 (56%) falso-positivos. Os parâmetros de desempenho de cada teste estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos em 138 amostras sorológicas testadas pelo antígeno microssomal de vermes adultos de *S. mansoni* em comparação aos resultados demonstrados pelo método Helmintex.

	Helmintex		Helmintex		Total	%
	Positivo	%	Negativo	%		
MAMA (+)	78	88,6	28	56,0	106	76,8
MAMA (-)	10	11,4	22	44,0	32	23,2
Total	88	100,0	50	100,0	138	100,0

Resultados previamente demonstrados pelo método Helmintex foram utilizados como referência para a confirmação da infecção por *S. mansoni*. Os soros de participantes com infecção ativa confirmados pelo método Helmintex foram analisados de acordo com a carga parasitária demonstrada pelo método parasitológico, sendo subdivididos em indivíduos com carga parasitária menor que 1 OPG, e indivíduos com carga parasitária igual ou maior que 1 OPG.

No grupo composto pelos participantes de baixa carga parasitária, do total de 52 amostras de soro testadas, 47 demonstraram reatividade ao antígeno MAMA, enquanto que apenas 5 amostras apresentaram resultado negativo (Tabela 2). A sensibilidade apresentada neste teste foi de 90,4% e a especificidade foi de 44%, com valores preditivos positivos e negativos de 62,7% e 81,5% respectivamente, com acurácia de 67,6%.

No grupo composto por indivíduos de carga parasitária igual ou superior a 1 OPG, um total de 36 amostras foram analisadas. Destas, 31 apresentaram resultados positivos, enquanto 5 amostras foram negativas (Tabela 3). A sensibilidade demonstrada neste teste foi de 86,1% e especificidade de 44%, sendo o valor preditivo positivo de 52,5% e valor preditivo negativo de 81,5% com acurácia de 61,6%.

Em conclusão, nota-se que os resultados obtidos com o antígeno MAMA apresentaram maior número de casos falso-positivos em amostras com cargas parasitárias inferiores a 1 OPG, enquanto que o maior percentual de resultados

falso-negativos foi apresentado nas amostras compostas por cargas parasitárias superiores a 1 OPG. Este resultado está demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Distribuição de resultados obtidos pelo antígeno MAMA de acordo com as cargas parasitárias apresentadas pelo método Helmintex, distribuídas entre 0,1 e 2,5 OPG, onde: 1) amostras com diagnóstico sorológico negativo; 2) amostras com diagnóstico sorológico positivo.

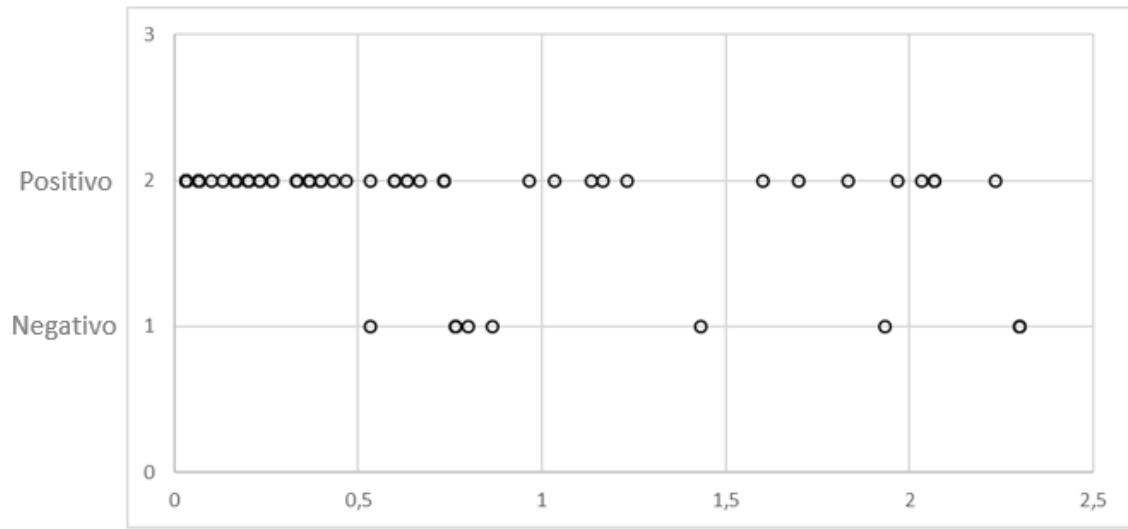


Tabela 2: Resultados comparativos entre amostras de soro reativas ao antígeno MAMA e a correlação com os resultados pelo método Helmintex em amostras com cargas parasitárias inferiores a 1 OPG.

	Helmintex: amostras < 1opg				Total	%
	Positivo	%	Negativo	%		
MAMA (+)	47	90,4	28	56,0	75	73,5
MAMA (-)	5	9,6	22	44,0	27	26,5
Total	52	100,0	50	100,0	102	100,0

Tabela 3: Resultados comparativos entre amostras de soro identificadas pelo antígeno MAMA e a correlação com os resultados demonstrados pelo método Helmintex em amostras com cargas parasitárias iguais ou superiores a 1 OPG.

Helmintex: amostras =>1opg						
	Positivo	%	Negativo	%	Total	%
MAMA (+)	31	86,1	28	56,0	59	68,6
MAMA (-)	5	13,9	22	44,0	27	31,4
Total	36	100,0	50	100,0	86	100,0

4. Discussão

O diagnóstico de pacientes infectados com *S. mansoni* com altas cargas parasitárias pode ser facilmente realizado por métodos parasitológicos clássicos. Métodos como Kato-Katz, imunodiagnóstico point-of-care para detecção de antígenos circulantes catódicos esquistossomóticos (POC-CCA) e ensaios sorológicos são amplamente utilizados em estudos epidemiológicos e em rotinas de diagnóstico em saúde (Pinheiro et al, 2012; Kittur et al, 2016; Lindholz et al, 2018; Center for Disease Control and Prevention, 2018). No entanto, tornou-se cada vez mais evidente que pacientes com baixa carga parasitária não são diagnosticados corretamente. Eventos como tratamento em massa de indivíduos de áreas endêmicas, realizados com tratamento oral de dose única, e movimentos migratórios das populações humanas podem estar contribuindo para a persistência dos parasitos e a ocorrência de baixas infecções parasitárias. Na tentativa de obter um diagnóstico acurado para esses pacientes, há uma necessidade de aplicação de métodos diagnósticos sensíveis que possam ser usados para confirmar as infecções nos casos em que os métodos clássicos apresentam baixa sensibilidade para o diagnóstico da esquistossomose (Sorgho et al, 2005; Grenfell et al, 2013).

O método Helmintex foi desenvolvido para aumentar a sensibilidade do diagnóstico da esquistossomose, e, em consequência, detectar infecções leves, até então não identificadas pelos métodos existentes (Teixeira et al, 2007). Atualmente,

este método é o mais sensível disponível para detecção de infecção por *S. mansoni*. Experimentos de semeadura demonstraram 100% de sensibilidade para cargas de ovos superiores a 1,3 OPG (Teixeira et al, 2007). Em um estudo anterior, demonstramos que a prevalência estimada pelo método de Helmintex foi 3 vezes maior do que os números apresentados pelo método Kato-Katz (Lindholz et al, 2018). Em adição a isto, a sensibilidade do Helmintex vem sendo testada em estudos de campo e tem demonstrado resultados superiores aos demais métodos disponíveis até o presente momento, especialmente em casos de baixas endemicidade (Caldeira et al, 2012; Pinheiro et al, 2012; Oliveira et al, 2018).

O sorodiagnóstico da esquistossomose conta com um grande número de técnicas disponíveis e preparações de antígenos, e de acordo com as técnicas de preparação, essas moléculas podem demonstrar variações em termos de sensibilidade, especificidade, complexidade e sofisticação (Abdel-Fattah et al, 2011). A purificação do antígeno microssomal de *S. mansoni* permitiu o desenvolvimento de ensaios rápidos, altamente específicos e sensíveis (Tsang et al, 1983), detectando anticorpos na infecção da esquistossomose com sensibilidade e especificidade de 98% e 99%, respectivamente (Hancock e Tsang, 1986).

Neste estudo, nós avaliamos o desempenho do antígeno MAMA versus o desempenho do método Helmintex. Em um total de 138 amostras analisadas, 88,6% das amostras apresentaram resultados positivos em ambos os testes, e 44% foram concordantes nas amostras de resultado negativo. No entanto, quando a carga parasitária foi analisada, o resultado apresentado pelo antígeno MAMA apresentou positividade em 90,4% e 86,1% para amostras contendo menos de 1 OPG e mais de 1 OPG, respectivamente.

A demonstração de resultados positivos e negativos, dependendo da carga parasitária, pode sugerir as diferentes concentrações de anticorpos entre as amostras, refletindo assim na sensibilidade apresentada pelo teste. Desempenhos similares foram demonstrados por van Lieshout e colaboradores (1992; 1995). A detecção de um percentual substancial (90,4 e 86,1%) das amostras positivas reativas ao antígeno MAMA certamente enfatiza a importância do imunodiagnóstico. Tsang (1984) e Maddison e colaboradores (1985) demonstraram que o antígeno MAMA apresenta menor reação contra soros heterólogos de pessoas infectadas por *S. haematobium*, *S. mekongi* e *S. japonicum*, e nenhuma reatividade cruzada

detectável com outros parasitos comuns em infecções humanas. Entretanto, neste estudo, nós demonstramos a ocorrência de 11,4% de resultados falso-negativos e 56% dos resultados falso-positivos em soros de participantes de uma área endêmica para esquistossomose.

A ocorrência dos resultados falso-negativos é um ponto importante no contexto da esquistossomose. Pessoas infectadas com baixa carga de ovos, ou em casos com tratamentos quimioterápicos sucessivos, podem iniciar uma resposta imunológica baixa. Neste caso, as subnotificações da infecção podem promover a transmissão contínua da doença (Sturrock, 2001). Por outro lado, a expressão de 56% dos resultados falso-positivos pode sugerir a ocorrência de reatividade cruzada com outras infecções parasitárias, ou ainda, estar indicando o diagnóstico de infecções passadas, apresentando a memória imunológica da infecção por *S. mansoni*.

Em conclusão, o teste sorológico utilizando o antígeno MAMA é uma ferramenta útil para o “*screening*” do diagnóstico da esquistossomose, entretanto, fatores como a dificuldade de obtenção dos antígenos e o alto custo financeiro e operacional, geram obstáculos para o uso e implantação do diagnóstico sorológico como rotina laboratorial. Embora o teste tenha demonstrado alta sensibilidade, a presença de resultados falso-positivos e falso-negativos é um fator importante para a subnotificação dos casos, colaborando na manutenção dos ciclos parasitários, e, conseqüentemente, representando uma adversidade ao plano de eliminação da esquistossomose.

5. Referências

Abdel-Fattah, M., Al-Sherbiny, M., Osman, A., Charmy, R., Tsang, V. (2011). Improving the detection limit of quantitative diagnosis of anti *S. haematobium* antibodies using Falcon Assay Screening Test (FAST) ELISA by developing a new standard curve. *Parasitology Research*, 108, 1457-1463. doi 10.1007/s00436-010-2198-y.

Calasans, T.A.S., Souza, G.T.R., Melo, C.M., Madi, R.R., Jeraldo, V.L.S. (2018). Socioenvironmental factors associated with *Schistosoma mansoni* infection and intermediate hosts in an urban area of northeastern Brazil. *PLoS ONE*, 13 (5), e0195519, doi.org/10.1371/journal.pone.0195519.

Caldeira, K., Teixeira, C.F., Silveira, M.B., Fries, L.C., Romanzini, J. (2012) Comparison of the Kato-Katz and Helmintex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Parana, southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5), 690-692.

Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Schistosomiasis: Resources for Health Professionals. Recuperado de: https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/health_professionals/index.html#dx

Doenhoff, M.J., Chiodini, P.L., Hamilton, J.V. (2004). Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitology*, 20, 35-39.

Favero, V, Frasca Candido, R., De Marco Verissimo, C., Jones, M., St. Pierre, T., Lindholz, C.G., Da Silva, V.,... Graeff-Teixeira, C. (2017). Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. *Experimental Parasitology*, 177, 28–34 doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.001 PMID: 28431921.

Grenfell, R.F.Q., Martins, W., Enk, M., Almeida, A., Siqueira, L., Silva-Moraes, V., Oliveira, E., Carneiro, N.F.F., Zech-Coelho, P.M. (2013). *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), 328-334.

Hancock, K., Tsang, V.C.W. (1986). Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunological Methods*, 92, 167-176.

Hinz, R., Schwarz, N.G., Hahn, A., Frickmann, H. (2017). Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. *Molecular and Cellular Probes*, 31, 2-21. doi:10.1016/j.mcp.2016.12.003.

Kittur, N., Castleman, J.D., Campbell, C.H. Jr., King, C.H., Colley, D.G. (2016). Comparison of *Schistosoma mansoni* prevalence and intensity of infection, as determined by the Circulating Cathodic Antigen Urine Assay or by the Kato-Katz Fecal Assay: A Systematic Review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3), 605-610. doi.org/10.4269/ajtmh.15-0725.

Lindholz, C.G., Favero, V., Verissimo, C.M., Candido, R.R.F., de Souza, R.P., dos Santos, R.R., Morassutti, A.L., Bittencourt, H.R., Jones, M.K., St. Pierre, T., Graeff-Teixeira, C. (2018). Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(3), e0006274. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.

Maddison, S.E., Slemenda, S.B., Tsang, V.C.W., Pollard, R.A. (1985). Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* with microsomal adult worm antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay using a standard curve developed with a reference serum pool. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(3), 484-494.

Oliveira, W.J., Magalhães, F.C., Elias, M.A.S., Castro, V.N., Favero, V., Lindholz, C.G., Oliveira, A.A., Barbosa, F.S., Gil, F., Gomes, M.A., Graeff-Teixeira, C., Enk, M.J., Coelho, P.M.Z., Carneiro, M., Negrão-Corrêa, D.A., Geiger, S.M. (2018). Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in

endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(2): e0006232. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.

Pinheiro, M.C., Carneiro, T.R., Hanemann, A.L., Oliveira, S.M., Bezerra, F.S. (2012). The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of *Schistosomiasis mansoni* in a low endemic setting in the state of Ceara, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 873-876.

Pontes, L.A., Dias-Neto, E., Rabello, A. (2002). Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), 157–162.

Ritchie, L.S. (1948). An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the United States Army Medical Department*, 8(4), 326.

Shane, H.L., Verani, J.R., Abudho, B., Montgomery, S.P., Blackstock, A.J., Mwinzi, P.N., Butler, S.E., Karanja, D.M., Secor, W.E. (2011). Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e951.

Smith, H., Doenhoff, M., Aitken, C., Bailey, W., Ji, M. (2012). Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9), e1815. doi:10.1371/journal.pntd.0001815.

Sorgho, H., Bahgat, M., Poda, J.N., Song, W., Kirsten, C., Doenhoff, M.J., Zongo, I., Ouédraogo, J.B., Ruppel, A. (2005). Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. *Acta Tropica*, 93, 169-180.

Sturrock, R.F. (2001). *Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go?* *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 17-27.

Teixeira, C.F., Neuhauss, 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 Neglected Tropical Diseases* 1(2): e73. doi:10.1371/journal.pntd.0000073.

Tsang, V.C., Hancock, K., Maddison, S.E., Beatty, A.L., Moss, D.M. (1984). Demonstration of species-specific and cross-reactive components of the adult microsomal antigens from *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* (MAMA and JAMA). *Journal Immunology*, 132(5), 2607-2613.

Tsang, V.C., Tsang, K.R., Hancock, K., Kelly, M.A., Wilson, B.C., Maddison, S.E. (1983). *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. *Journal Immunology*, 130(3), 1359-1365.

van Lieshout, L., De Jonge, N., El Masry, N.A., Mansour, M.M., Krijger, F.W., Deelder, A.M. (1992). Improved diagnostic performance of the circulating antigen assay in human schistosomiasis by parallel testing of circulating anodic and cathodic antigens in serum and urine. *The American Journal for Tropical Medicine and Hygiene*, 47, 463-469.

van Lieshout, L., Panday, U.G., De Jonge, N., Krijger, F.W., Oostburg, B.F., Polderman, A.M., Deelder, A.M. (1995). Immunodiagnosis of schistosomiasis mansoni in a low endemic area in Suriname by determination of the circulating antigens CAA and CCA. *Acta Tropica*, 59, 19-29.

World Health Organization (2013). *Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020*. Geneva, Switzerland.

Zoni, A.C., Catala, L., Ault, S.K. (2014). Schistosomiasis prevalence and intensity of infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942–2014: A systematic review in the context of a regional elimination goal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004493, doi.org/10.1371/journal.pntd.0004493.

Capítulo III

Rascunho de manuscrito a ser submetido ao periódico *International Journal for Parasitology*, intitulado “**Genetic diversity within *Schistosoma mansoni*: DNA barcoding reveals one genetic group in Brazil**”

1. Introdução

A esquistossomose é uma parasitose de ampla ocorrência, afetando cerca de 240 milhões de pessoas em 78 países distribuídos pela África, Oriente Médio, Índias Ocidentais e América do Sul (WHO, 2018), permanecendo entre as maiores infecções negligenciadas mundialmente reconhecidas (Webster et al, 2013). O *Schistosoma mansoni* é uma das espécies causadora de infecção intestinal em humanos, com maiores índices de ocorrência na África Sub-Saariana, Península Arábica e América do Sul (Stothard et al, 2009).

Dentre as regiões de ocorrência na América do Sul, o Brasil constitui o país com maior número de casos registrados (Pan-American Health Organization, 2009). Neste país, a infecção ocorre em uma faixa contínua entre os estados do Rio Grande do Norte até o norte de Minas Gerais, apresentando focos isolados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2018), onde, inicialmente, diversas populações de *S. mansoni* foram introduzidas, via oceano Atlântico, com a chegada de escravos trazidos da África durante os séculos XVI a XIX, e foram se diversificando através de movimentos migratórios e de características ambientais favoráveis à dispersão do parasito (Crellen et al, 2016). A ampla ocorrência geográfica, a diversidade de hospedeiros definitivos (primatas humanos, não humanos e redores), associados a um pequeno número de hospedeiros intermediários (planorbídeos do gênero *Biomphalaria*) desperta curiosidade sobre os aspectos de diversidade genética apresentados pelo parasito (Webster et al, 2013).

Em adição, em áreas de alta prevalência carentes de saneamento básico, o tratamento massivo com Praziquantel tende a promover a redução da morbidade dos indivíduos infectados, favorecendo o surgimento de subpopulações do parasito (Fenwick & Webster, 2006; Knopp et al, 2013). Neste estudo, nós investigamos a

ocorrência de diversidade genética entre cinco isolados brasileiros de *S. mansoni*, provenientes de duas regiões distintas dos Estados de Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, através da técnica de “*DNA barcoding*” utilizando a variação de sequências genéticas da subunidade *cox 1* do DNA mitocondrial, e procuramos identificar diferenças evolutivas entre os isolados, em comparação a isolados africanos provindos do Senegal, Nigéria, Mali, Camarões, Uganda, Quênia, Tanzânia e Zâmbia, previamente depositados na SCAN (*Schistosomiasis Collection - Natural History Museum of London*).

2. Material e Métodos

Localidades amostrais: Foram utilizadas amostras de ovos e miracídios das localidades de Estância, Propriá (Sergipe) e Januária (Minas Gerais), e amostras de ovos, miracídios, cercárias e vermes adultos de Sumidouro (Rio de Janeiro), e Esteio (Rio Grande do Sul). As amostras provindas da localidade Estância e Propriá foram coletadas durante a realização de estudo anterior, realizado entre Outubro e Novembro de 2015 (Lindholz et al, 2018) aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e registrado sob o protocolo número 48809715.1.0000.5336. Amostras oriundas de Esteio (Rio Grande do Sul) foram isoladas pelo Laboratório de Biologia Parasitária da Escola de Ciências da PUCRS, onde o ciclo biológico é mantido com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS (registro número 15/00443). As amostras oriundas de Januária (Minas Gerais) e Sumidouro (Rio de Janeiro) foram obtidas através de colaborações estabelecidas com a Universidade Federal de Minas Gerais e com a Fundação Oswaldo Cruz, respectivamente. Foram utilizados como grupos comparativos os isolados do Senegal, Nigéria, Mali, Camarões, Uganda, Quênia, Tanzânia e Zâmbia, com sequências genéticas depositadas na SCAN. Este trabalho foi desenvolvido no *Wolfson Wellcome Biomedical Laboratory, Zoology Department, Natural History Museum of London* (Londres, Reino Unido).

Preparação e extração de DNA: As amostras coletadas no Brasil foram preservadas em etanol 70%, armazenadas individualmente de acordo com o estágio de vida do parasito e localidade amostral. O DNA foi extraído individualmente de

cada forma parasitária, utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen Ltd, Crawley, UK) e eluído em 50 µL de solução tampão, obtendo uma concentração final de 3,5 a 30 ng/ µL de DNA total de cada amostra. 1 µL de cada amostra foi utilizado para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

PCR da região citocromo C oxidase subunidade I (*cox I*): Para cada forma parasitária, foram amplificados 450 pb da região mitocondrial *cox I*. Para a PCR, foi utilizado o volume final de 25 µL, utilizando o kit Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, UK), e 10 pmol de cada *primer* (*Forward primer*: Asmit 1 (Stothard et al, 2009) e *Reverse primer* COX1_Schist_3' (Lockyer et al, 2003). Os ciclos térmicos foram realizados em termociclador GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, UK). As condições utilizadas na PCR foram: 5 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 40 °C e 1:30 min a 72 °C, finalizando com um período de extensão final de 10 min a 72 °C. Quatro microlitros de cada amplicon foram visualizados em gel de agarose 0,8%, utilizando GelDoc GBox F3-LFB através do programa GeneSys Versão 1.5.6.0. As amostras positivas foram purificadas utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Ltd, UK) e sequenciadas pelo método Sanger em ambas as direções, utilizando a diluição de 1 pmol dos *primers* inicialmente usados na PCR.

PCR da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS 1 + 2): Para comparar as variações encontradas no mtDNA com o DNA nuclear, o rDNA completo da região ITS (927 pb) foi amplificado em todas as amostras analisadas. Os *primers* utilizados foram *Forward* e *Reverse* ITS 1 + ITS 2 (Kane & Rollinson, 1994), e a PCR ocorreu nas seguintes condições: 5 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 58 °C e 1:30 min a 72 °C, finalizando com um período de extensão final de 10 min a 72 °C. Todas as amostras analisadas neste estudo tiveram a confirmação do gênero *Schistosoma* obtida pela análise do marcador nuclear ITS. A extração, purificação e sequenciamento de DNA seguiram os mesmos protocolos utilizados para *cox I*.

Análise de sequenciamento de DNA: As sequências obtidas foram editadas manualmente utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) para remoção das ambiguidades e

observação das posições polimórficas entre as amostras. A identidade das sequências obtidas foi confirmada utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (Blast) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências genéticas obtidas, o número de haplótipos únicos e a diversidade de haplótipos e de nucleotídeos por sequência foram analisados através do programa DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) versão 5 (http://www.ub.edu/dnasp/index_v5.html).

Análises filogenéticas: Todas as sequências de haplótipos *cox 1* e ITS foram analisadas através do programa MEGA5 (Tamura et al, 2011). Os alinhamentos filogenéticos foram desenhados com uso do programa jModelTest 2 (<http://jmodeltest.org>.) Relações evolutivas entre as amostras foram inferidas aplicando os métodos de *Neighbour-Joining* (Saitou & Nei, 1987) e Máxima Parcimônia. As topologias foram desenhadas utilizando *Schistosoma rodhaini* como grupo externo.

3. Resultados

Ao total, foram obtidas 47 sequências genéticas de isolados de cinco diferentes localidades brasileiras: Estância e Propriá (Sergipe); Januária (Minas Gerais); Sumidouro (Rio de Janeiro) e Esteio (Rio Grande do Sul) (Tabela 1), através das quais foram analisadas a diversidade local dos isolados amostrados. A fim de investigar a possível origem genotípica e separação geográfica destes isolados, foram utilizados como grupos comparativos diversas sequências genéticas provindas de isolados do Senegal, Nigéria, Mali, Camarões, Uganda, Quênia, Tanzânia e Zâmbia, previamente analisados (Webster et al, 2013), e depositados em bancos genéticos da *Schistosomiasis Collection - Natural History Museum of London*. As análises de diversidade genética utilizando o DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) revelaram uma diversidade de haplótipos de 0,333, enquanto que o padrão de variabilidade genética entre as sequências foi de 0,215, não demonstrando variações genéticas significativas entre os isolados brasileiros abordados nesta análise.

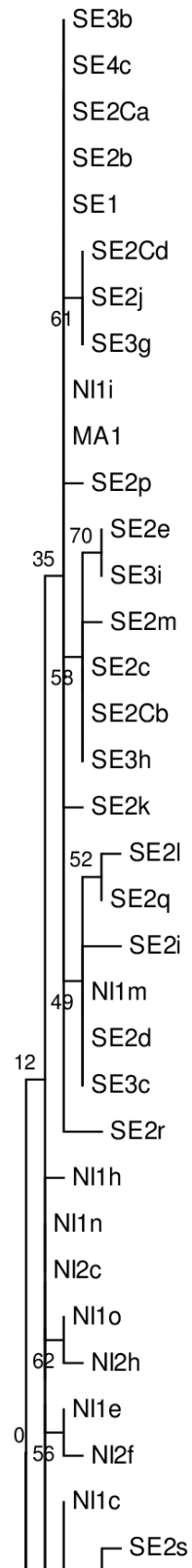
Tabela 1: Descrição das 47 sequências genéticas obtidas de isolados de cinco diferentes localidades brasileiras: Estância e Propriá (Sergipe); Januária (Minas Gerais); Sumidouro (Rio de Janeiro) e Esteio (Rio Grande do Sul).

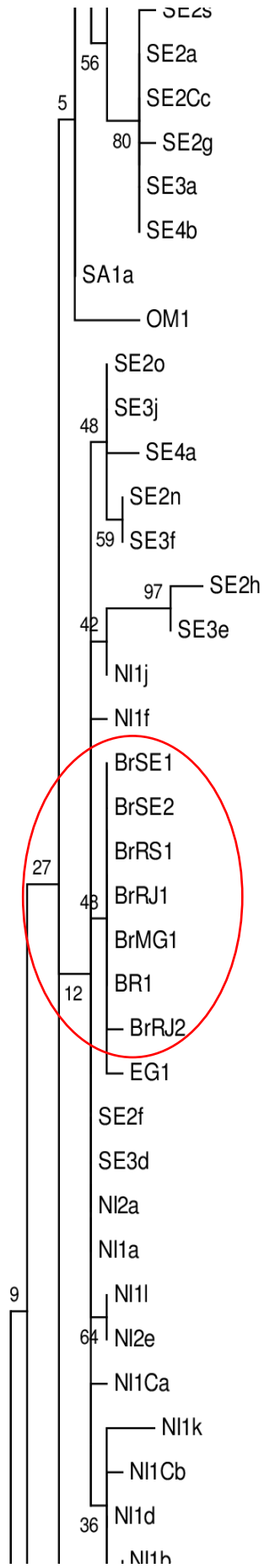
Localidade	Código Localidade	Descrição da amostra	Código sequência
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG1
Minas Gerais	MG	Verme adulto fêmea	MG2
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG3
Minas Gerais	MG	Cercária	MG 4
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG5
Minas Gerais	MG	Verme adulto fêmea	MG6
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG7
Minas Gerais	MG	Cercária	MG8
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG9
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG10
Minas Gerais	MG	Verme adulto fêmea	MG11
Minas Gerais	MG	Verme adulto macho	MG12
Minas Gerais	MG	Verme adulto fêmea	MG13
Minas Gerais	MG	Cercária	MG14
Minas Gerais	MG	Cercária	MG15
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS1
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS2
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto fêmea	RS3
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto fêmea	RS4
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS5
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS6
Rio Grande do Sul	RS	Cercária	RS7
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS8
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto fêmea	RS9
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS10
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto fêmea	RS11
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto fêmea	RS12
Rio Grande do Sul	RS	Verme adulto macho	RS13
Rio Grande do Sul	RS	Ovos	RS14
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto fêmea	RJ1
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto macho	RJ2
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto macho	RJ13
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto macho	RJ14
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto macho	RJ15
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto fêmea	RJ16
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto macho	RJ17
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto macho	RJ18
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto fêmea	RJ19
Rio de Janeiro	RJ	Miracídio	RJ20
Rio de Janeiro	RJ	Verme adulto fêmea	RJ21
Rio de Janeiro	RJ	Cercária	RJ22
Sergipe Propriá	BrSEProp	Cercária	BrSEProp1
Sergipe Propriá	BrSEProp	Cercária	BrSEProp2
Sergipe Propriá	BrSEProp	Cercária	BrSEProp3
Sergipe Propriá	BrSEProp	Cercária	BrSEProp4
Sergipe Estância	BrSEEst	Miracídio	BrSEEst1
Sergipe Estância	BrSEEst	Miracídio	BrSEEst2

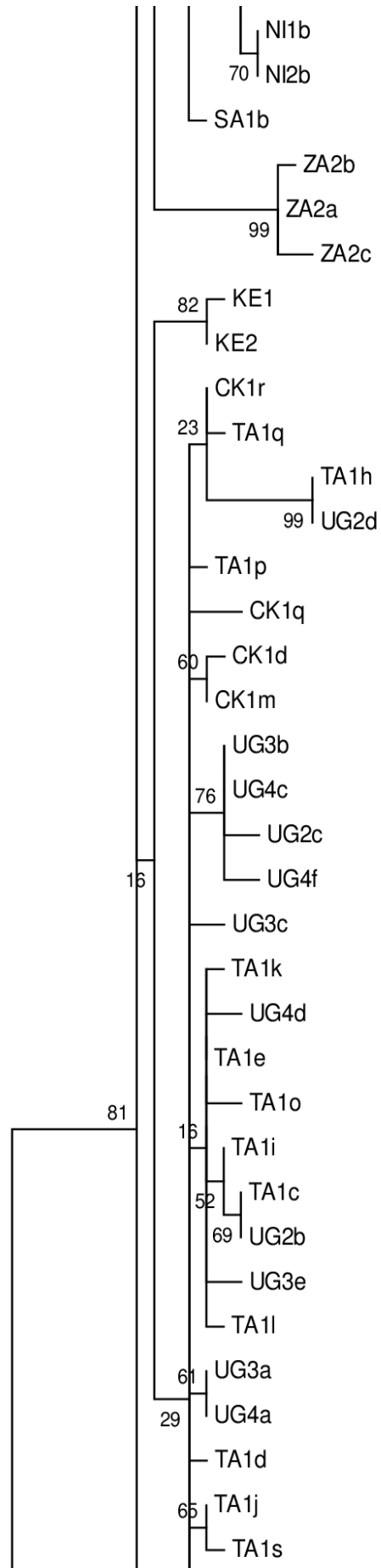
Ao total, as sequências submetidas às análises revelaram a ocorrência de apenas dois haplótipos entre as amostras brasileiras, sendo um composto pelas amostras originárias de Propriá e Estância (Sergipe) e Januária (Minas Gerais), e outro pelas amostras do isolado Sumidouro (Rio de Janeiro). O grupo externo, utilizado para comparação, é formado por 120 haplótipos previamente descritos, separados em cinco linhagens genéticas distintas (Webster et al, 2013). Aplicando o método de agrupamento filogenético de Máxima Parcimônia, foi observado que as sequências de isolados do Brasil aparentam ter uma associação genética mais similar às sequências do Senegal e Nigéria, em comparação aos demais países analisados, sugerindo a possível origem das linhagens brasileiras nestas regiões da África.

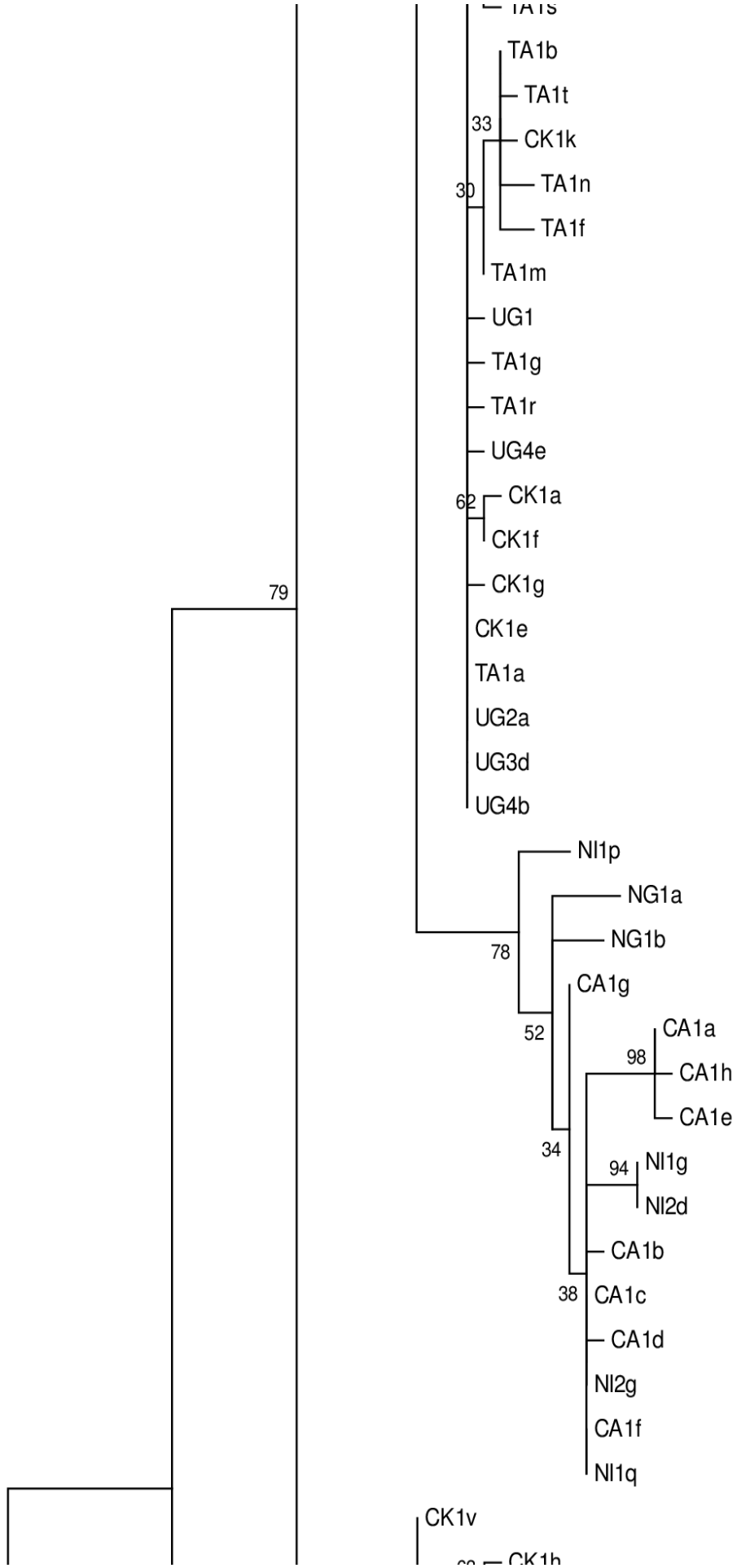
A organização filogenética mais parcimoniosa obtida entre as sequências genéticas utilizadas neste estudo está representada na Figura 1. A irradiação das linhagens de *S. mansoni* abordadas neste estudo podem ser melhor visualizadas através da Figura 2, onde cada linha pequena representa uma pequena alteração nos pares de bases, e os círculos menores representam linhagens sem amostragem suficiente para inferência de correlação evolutiva ou a ocorrência de haplótipos extintos.

Figura 1: Alinhamentos filogenéticos desenhados com uso do programa jModelTest 2 (<http://jmodeltest.org>) demonstrando as relações evolutivas entre os isolados de Sergipe, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e isolados do Senegal, Nigéria, Mali, Camarões, Uganda, Quênia, Tanzânia e Zâmbia, utilizando como grupo externo *S. rodhaini*.









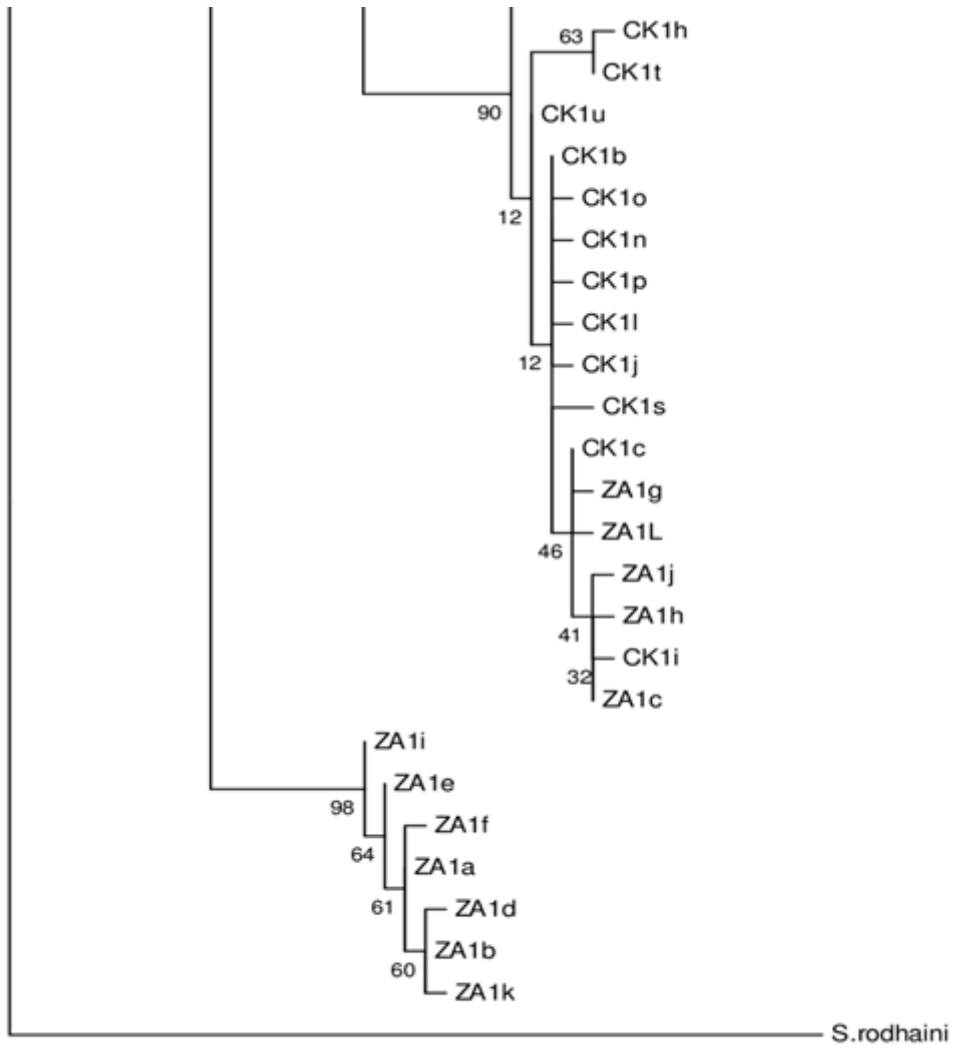
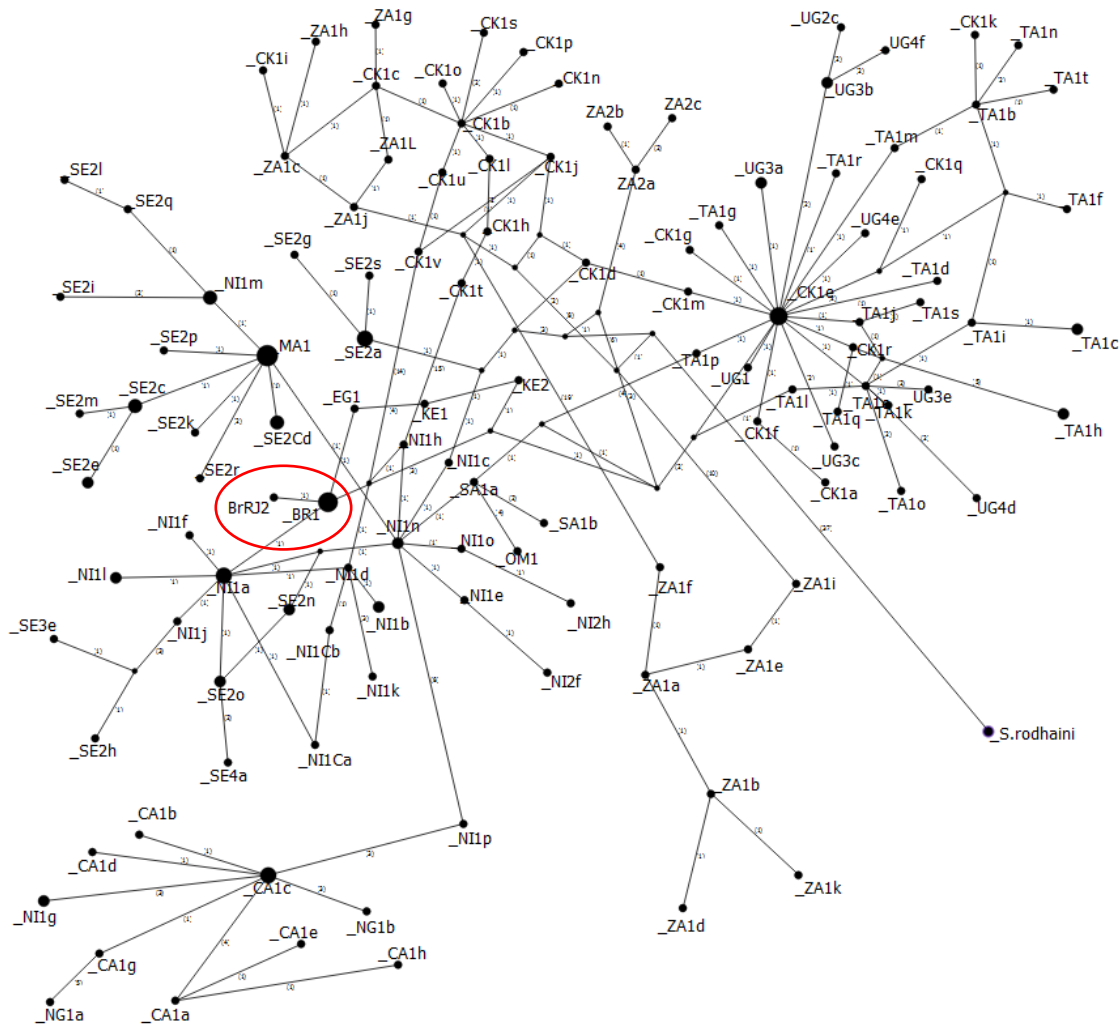


Figura 2: Rede de conexão entre todos os haplótipos utilizados neste estudo, gerada a partir do critério de Máxima Parcimônia, com uso do programa Population Analysis with Reticulate Trees (<http://popart.otago.ac.nz/index.shtml>).



4. Discussão

A técnica de DNA “*barcoding*” vêm sendo utilizada em muitos estudos investigativos de estruturação de populações e diversidades intra e interespecíficas. Nesta abordagem, os estudos mais frequentemente desenvolvidos, explorando espécies de *Schistosoma* através de investigações com mtDNA têm demonstrado alta diversidade entre populações de áreas endêmicas (Morgan et al, 2005; Stothard et al, 2009; Webster et al, 2013; Gower et al, 2017). Variações genéticas do mtDNA *cox 1* de populações de *Schistosoma* sp. não raramente apresentam variações

genéticas entre populações do parasito, acumulando consideráveis números de substituições de nucleotídeos (Zarowiecki et al, 2007).

Neste estudo, foi utilizado o mtDNA *cox I* “*barcoding*” para analisar a diversidade genética de *S. mansoni* de cinco diferentes localidades do Brasil, em comparação a isolados de 22 localidades diferentes, oriundas de países africanos. Foram utilizadas amostras de DNA individualmente extraídas de ovos, miracídios, cercárias e vermes adultos de *S. mansoni* dos isolados brasileiros, a fim de minimizar contaminações e potencializar as análises individuais. Ao final do processamento das amostras, um total de 47 sequências genéticas foi utilizado para comparação de diversidade genética. As análises demonstraram a presença de dois haplótipos presentes entre os isolados brasileiros, sendo um composto pelos isolados oriundos dos estados de Sergipe, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, e outro composto pelo isolado provindo do Rio de Janeiro. A diversidade de haplótipos obtida é considerada baixa (0,333), e o padrão de variabilidade genética entre as sequências não demonstrou variações genéticas significativas entre os isolados brasileiros abordados nesta análise.

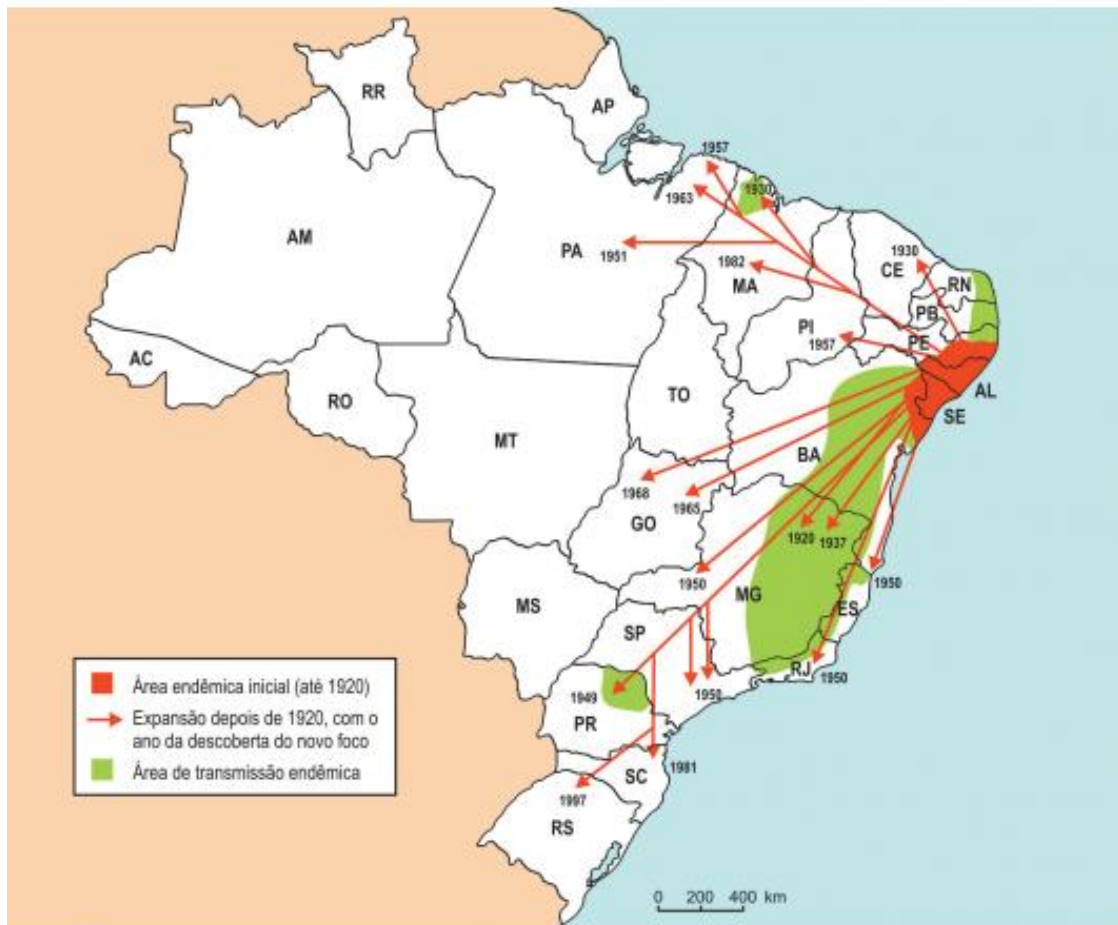
Webster e colaboradores (2013), utilizando metodologia similar, compararam a diversidade genética de isolados de *S. mansoni* provenientes da África, América do Sul, Arábia Saudita e Omã, onde demonstraram a ocorrência de ampla diversidade genética do parasito entre os isolados africanos, resultando em 120 haplótipos de 22 localidades, majoritariamente isoladas da natureza, refletindo o total de cinco linhagens parasitárias diferentes.

As populações de *S. mansoni* foram introduzidas na América do Sul via oceano Atlântico, com a chegada de escravos trazidos da África durante os séculos XVI a XIX (Crellen et al, 2016). Atualmente, esta hipótese é a melhor aceita, e vem sendo suportada por dados obtidos utilizando técnicas de DNA *barcoding* e de microssatélites, as quais revelam menores índices de diversidade genética entre isolados da África Ocidental e das Américas, sugerindo a introdução recente do parasito no Novo Mundo (Morgan et al, 2005; Gower et al, 2013).

Desde meados do século XVI, um grande número de africanos desembarcou nos portos brasileiros. O tráfico transatlântico contribuiu no povoamento do Brasil por grupos vindos de diversas regiões da África, de maneira que no início, grande parte dos escravos que chegavam aos portos nordestinos provinham da região do

Senegal e Gâmbia, de onde variadas etnias eram deportadas. Para as províncias do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul, a região da Angola foi a principal área de exportação. Após 1815, quando houve intensificação dos esforços ingleses no impedimento do tráfico negreiro, os traficantes do Rio de Janeiro passaram a abordar a costa ocidental da África, região atual da Tanzânia, norte de Moçambique, Malauí e nordeste de Zâmbia, enquanto que traficantes de Salvador concentraram suas capturas na região sudoeste da atual Nigéria (Albuquerque & Fraga-Filho, 2006). Uma vez capturados, e transportados via oceano Atlântico, os africanos desembarcavam nos principais portos brasileiros, como Rio de Janeiro, Salvador, Recife, Fortaleza, Belém e São Luiz, de onde eram distribuídos a praticamente todas as regiões do país. Desta forma, o regime de escravidão possibilitou a chegada de muitos indivíduos infectados por *S. mansoni*. Este fato, associado aos movimentos migratórios, às ausentes ou precárias condições sanitárias, e a presença do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) são alguns dos principais fatores que contribuíram para a dispersão da esquistossomose no Brasil, inicialmente expandida pela região nordeste, formando extensa área de transmissão entre os estados do Rio Grande do Norte e a Bahia, e posteriormente, passando a ocorrer em outras localidades em focos isolados (Figura 3) (Ministério da Saúde, 2014).

Figura 3: Representação do processo de dispersão da esquistossomose mansônica no Brasil.



Fonte: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Vigilância da esquistossomose mansoni, diretrizes técnicas, Brasília, Distrito Federal (2014).

Considerando o contexto histórico, a propagação da infecção foi e continua sendo favorecida por alguns aspectos como: longevidade dos vermes adultos; capacidade das fêmeas em depositar um alto número de ovos por dia; caráter crônico da infecção (refletido na ausência de procura pelo tratamento), contaminação de coleções hídricas, os fluxos migratórios e hábitos de vida do homem, associados a ampla distribuição de hospedeiros intermediários e precariedade/ausência condições sanitárias (Ministério da Saúde, 2014). Estas características refletem as diferenças na estrutura genética do parasito, e suas adaptações ao meio ao qual ocorre. Um estudo desenvolvido no Senegal usando marcadores de microssatélites demonstrou a distribuição aleatória de variação genética entre parasitos de diferentes lugares e hospedeiros, confirmando a idéia de

que, um homem infectado potencialmente é um reservatório de subpopulações de *Schistosoma* (Broeck et al, 2014).

Neste contexto, com o objetivo de elucidar a origem genética do *S. mansoni* nas diferentes regiões abordadas neste estudo, foram analisadas amostras oriundas de cinco regiões brasileiras distintas, em comparação a amostras oriundas de 22 regiões diferentes, distribuídas entre 8 países africanos (Senegal, Nigéria, Mali, Camarões, Uganda, Quênia, Tanzânia e Zâmbia). Os resultados obtidos demonstraram que os isolados brasileiros são mais aparentados geneticamente com isolados oriundos do Senegal e Nigéria, em comparação aos demais países africanos analisados, sugerindo a possível origem das linhagens brasileiras nestas regiões da África. Desta forma, a introdução recente do parasito, em comparação ao tempo de ocorrência e evolução parasito-hospedeiro presente nas regiões africanas pode estar justificando a baixa variabilidade genética dos isolados utilizados para comparação no presente trabalho. Em adição a isto, as amostras provindas de Minas Gerais, Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul foram, inicialmente, isoladas na natureza, entretanto são mantidas em laboratório por variados períodos de tempo. Este fato pode estar contribuindo com a redução da variabilidade genética dos parasitos, uma vez que os ciclos de infecção apresentam menor disponibilidade de hospedeiros em ambientes controlados (Han et al, 2009; King et al, 2015; Webster et al, 2015). As informações sobre diversidade genética e correlação entre isolados dos parasitos entre Brasil e África demonstrados neste trabalho, sugerem relações evolutivas entre as linhagens de *S. mansoni*, e apresentam um vasto campo para a pesquisa, uma vez que as informações sobre as rotas de dispersão e estabelecimento de focos da esquistossomose no território brasileiro são escassas na literatura. Em adição a isto, a ocorrência de variadas linhagens do parasito em uma mesma região tende a alterar a dinâmica de transmissão da infecção, podendo aumentar os níveis de patogenicidade e resistência a fármacos, influenciando na seleção genética dos parasitos, favorecendo fenótipos mais adaptados.

5. Referências

Albuquerque, W.R.D., Fraga-Filho, W. (2006). Uma história do negro no Brasil. Salvador: Centro de Estudos Afro-Orientais, Fundação Cultural Palmares. Brasília, Distrito Federal.

- Broeck, F.V., Meurs, L., Raeymaekers, J.A.M., Boon, N., Dieye, T.N., Volckaert, F.A.M., Polman, K., Huyse, T. (2014). Inbreeding within human *Schistosoma mansoni*: do host-specific factors shape the genetic composition of parasite populations? *Heredity*, 113, 32-41.
- Crellen, T., Allan, F., David, S., Durrant, C., Huckvale, T., Holroyd, N., Emery, A.M., Rollinson, D., Aanensen, D.M., Berriman, M., Webster, J.P., Cotton, J.A. (2016). Whole genome resequencing of the human parasite *Schistosoma mansoni* reveals population history and effects of selection. *Nature Scientific Reports* 6, 20954.
- Fenwick, A., Webster, J.P. (2006). Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19, 577-582.
- Gower, C.M., Gehre, F., Marques, S.R., Lamberton, P.H.L., Lwambo, N., Webster, J.P. (2017). Phenotypic and genotypic monitoring of *Schistosoma mansoni* in Tanzanian schoolchildren five years into a preventative chemotherapy national control programme. *Parasites & Vectors*, 10, 593. doi10.1186/s13071-017-2533-6.
- Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y., Chen, Z. (2009). *Schistosoma* Genomics: new perspectives on Schistosome biology and host-parasite interaction. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 211-240.
- Kane, R.A., Rollinson, D. (1994). Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63, 153-156.
- King, K.C., Stelkens, R.B., Webster, J.P., Smith, D.F., Brockhurst, M.A. (2015). Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. *PLoS Pathogens*, 11, e1005098.
- Knopp, J., Stothard, J.R., Rollinson, D., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Martib, H., Utizgera, J. (2013). From morbidity control to transmission control: time to change tactics against helminths in Unguja. *Acta Tropica*, 128, 412-422.
- Lindholz, C.G., Favero, V., Verissimo, C.M., Candido, R.R.F., de Souza, R.P., dos Santos, R.R., Morassutti, A.L., Bittencourt, H.R., Jones, M.K., St. Pierre, T., Graeff-Teixeira, C. (2018). Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(3), e0006274. doi.org/10.1371/journal.pntd.0006274.
- Lockyer, A.E., Olson, P.D., Ostergaard, P., Rollinson, D., Johnston, D.A., Attwood, S.W., Southgate, V.R., Horak, P., Snyder, S.D., Le, T.H., Agatsuma, T., Mcmanus, D.P., Carmichael, A.C., Naem, S., Littlewood, D.T. (2003). The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology* 126, 203- 224.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2018). Educação em saúde para o controle da esquistossomose. Brasília, Distrito Federal.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2014) Vigilância da Esquistossomose mansoni, diretrizes técnicas. Brasília, Distrito Federal.

Morgan, J.A., Dejong, R.J., Adeoye, G.O., Ansa, E.D., Barbosa, C., Brémond, P., Cesari, I.M., Charbonnel, N., Corrêa, L.R., Coulibaly, G., D'andrea, O.S., Souza, C.P., Doenhoff, M.J., File, S., Idris, M.A., Incani, R.N., Jarne, P., Karanja, D.M.S., Kazibwe, F. (2005). Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology*, 14, 3889-3902. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02709.x.

Pan-American Health Organization. Epidemiological profiles of neglected diseases and other infections related to poverty in Latin America and the Caribbean. (2009) Recuperado de <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2009/nds-epi-profiles.pdf>.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.

Stothard, J.R., Webster, B.L., Weber, T., Nyakaana, S., Webster, J.P., Kazibwe, F., Kabatereine, N.B., Rollinson, D. (2009). Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni* in Uganda: DNA barcoding reveals substantial genetic diversity within Lake Albert and Lake Victoria populations. *Parasitology*, 136, 1813-1824.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

Webster, B.L., Rabone, M., Pennance, T., Emery, A.M., Allan, F., Gouvras, A., Knopp, S., Hamidou, A.A., Mohammed, K.A., Ame, S.M., Rollinson, D., Webster, J.P. (2015). Development of novel multiplex microsatellite polymerase chain reactions to enable high-throughput population genetic studies of *Schistosoma haematobium*. *Parasit Vectors*, 8, 432. doi.org/10.1186/s13071-015-1044-6.

Webster, B.L., Webster, J.P., Gouvras, A.N., Garba, A., Lamine, M.S., Diaw, O.T., Seye, M.M., Tchuenté, L.A., Simoonga, C., Mubila, L., Mwanga, J.R., Lwambo, N.J., Kabatereine, N.B., Lange, C.N., Kariuki, C., Mkoji, G.M., Rollinson, D., Stothard, J.R. (2013). DNA 'barcoding' of *Schistosoma mansoni* across sub-Saharan Africa supports substantial within locality diversity and geographical separation of genotypes. *Acta Tropica*, 128, 250-260.

World Health Organization. (2018). Schistosomiasis: Infection and transmission. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.

Zarowiecki, M., Huyse, T., Littlewood, D.T. (2007). Making the most of mitochondrial genomes – markers of phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* Platyhelminthes: Digenea. *International Journal for Parasitology* 37, 1401-1418.

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http://www.ub.edu/dnasp/index_v5.html

<http://jmodeltest.org>.

ANEXO

Aprendizados e experiências obtidos durante o Doutorado

O projeto “Estância” surgiu como fruto de uma antiga necessidade do Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, e que, nos últimos anos, veio tomando forma diante das parcerias estabelecidas entre o Grupo de Pesquisa e as Secretarias de Saúde do Estado de Sergipe e do Município de Estância, especialmente com a Equipe de Controle de Endemias deste Município. Como questionamentos fundamentais para o desenvolvimento deste estudo, foram considerados os dados disponíveis da literatura sobre comparação de métodos diagnósticos da esquistossomose, especialmente os desenvolvidos em território brasileiro, com aplicação do método Helmintex, em associação à necessidade de avaliação de desempenho dos métodos diagnósticos correlacionados com a carga parasitária dos indivíduos infectados, possibilitando assim, a descrição das sensibilidades e fragilidades apontadas por cada método abordado no estudo.

Anteriormente ao desenvolvimento deste projeto, algumas pesquisas utilizaram o método Helmintex em estudos de comparação de desempenho (Caldeira et al, 2012; Pinheiro et al, 2012; Oliveira et al, 2018), entretanto, os grupos amostrais abordados nestas investigações não ultrapassaram o total de 250 indivíduos. Em adição, muitas das amostras fecais utilizadas nestes estudos apresentaram alta carga parasitária, favorecendo o diagnóstico parasitológico, mesmo quando utilizados métodos de sensibilidade reduzida. Neste contexto, surgiu o projeto “Estância”, visando a abordagem de um grande número de amostras biológicas (fezes, urina e sangue), em uma região de média prevalência (inicialmente determinada em 25% - dados da Secretaria Municipal de Saúde de Estância em comunicação pessoal). Devido às características do local, e da dinâmica de infecção apresentada, nós pensamos na hipótese de ocorrência de uma ampla distribuição de cargas parasitárias entre os indivíduos infectados, fato que estaria favorecendo a subestimativa da prevalência naquela localidade. Diante do cenário apresentado, em associação à necessidade de estabelecimento de um método de referência no diagnóstico da esquistossomose, nós desenvolvemos este

projeto de pesquisa na localidade Candéal, município de Estância, Estado de Sergipe, Brasil.

A experiência da elaboração de ideias, escrita e desenvolvimento de um projeto de Doutorado é, sem dúvida, um processo de crescimento e amadurecimento constante e incalculável. Diante da proposta de amostrar indivíduos em uma comunidade tão distante, geograficamente e culturalmente da nossa, não foram medidos esforços e dedicação para que o melhor trabalho fosse realizado. As expedições a campo, a equipe de trabalho composta por integrantes do Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, por colaboradores da Secretaria Municipal de Saúde, líderes comunitários e pela comunidade local, deram a este trabalho um sentido muito mais amplo do que ao qual ele se propunha inicialmente, quando fora pensado sobre a estrita avaliação dos métodos diagnósticos.

Diariamente, nós despendíamos 12 horas do dia entre atividades na comunidade (cadastramento de participantes, distribuição e coleta dos frascos coletores; esclarecimento de dúvidas, atividades de educação em saúde) e atividades no laboratório (processamento das amostras e acondicionamento de material biológico). Após o “término do expediente”, as planilhas de coletas eram atualizadas, os dados coletados eram contabilizados, e os diários de campo eram escritos. Neste momento, posso dizer que o fato de o sol nascer às 4:30 da manhã já não era um fator limitante, tamanho era o cansaço quando finalmente chegava o momento de dormirmos nossas preciosas 4 horas de sono. Afinal de contas, como diz meu orientador, “dormir pra que, guria?”! No dia seguinte nossa missão recomeçava, e o aprendizado era diário e contínuo durante todo o período que passamos em Candéal, durante as duas expedições realizadas.

O convívio intenso com a comunidade, as atividades de educação em saúde desenvolvidas na escola municipal Dr. Antonio Manuel de Carvalho Dantas, as atividades de laboratório realizadas na Unidade Básica de Saúde Clóvis Franco e as redes de contatos estabelecidas durante todo o desenvolvimento deste projeto são resultados que não podem ser quantificados, mas, certamente foram alguns dos maiores aprendizados durante o processo de Doutorado. Ao total, foram coletadas amostras biológicas de aproximadamente 700 indivíduos voluntários, durante 20 dias de expedição em campo. Após realização dos exames de fezes, os participantes receberam os laudos médicos pessoalmente e individualmente, e

foram orientados quanto ao tratamento e medidas de prevenção da infecção. Paralelamente a isto, ações de mobilização da comunidade foram realizadas com apoio e estímulo do líder comunitário, resultando na implantação de uma caixa d'água na comunidade Candéal, reduzindo assim, o contato com fontes de infecção da esquistossomose. Adicionalmente, foram realizadas atividades de popularização da ciência e educação em saúde através de entrevista a rádio local, onde foram discutidos os nossos objetivos, métodos e os benefícios do desenvolvimento deste tipo de abordagem a cada comunidade alvo.

Em contrapartida, inúmeros foram os esforços no sentido de desenvolver habilidades de compreensão, colaboração e convívio com esferas até então distantes da minha realidade. Durante o desenvolvimento do projeto Estância, pude conhecer e conviver com inúmeros personagens, de diferentes escalas sociais e cada um desempenhando um papel importante neste contexto. O desenvolvimento deste projeto em parceria com instituições públicas e seus servidores, Estaduais e Municipais, me propiciou o conhecimento na prática de suas rotinas. Muitos atores foram marcantes aqui, positiva e negativamente. Tivemos a satisfação em trabalhar com a Equipe de Controle de Endemias da Secretaria Municipal de Saúde de Estância, que em momento algum mediu esforços em colaborar para o melhor resultado possível no desenvolvimento do projeto, posição esta também abordada pela diretoria da Unidade Básica de Saúde na qual desenvolvemos as atividades de laboratório, e, igualmente, nas pessoas que compunham a administração da Escola onde grande parte dos nossos encontros comunitários foram realizados. Entretanto, algumas situações e adversidades nos mostraram outras realidades, que, infelizmente, se repetem na prestação de muitos dos serviços públicos do nosso país. A saber, citando um breve exemplo: durante o desenvolvimento de nossa rotina de laboratório, todos os minutos eram preciosos, devido à quantidade de amostras biológicas processadas por dia, e com os recursos físicos e de pessoal limitados. Enquanto desenvolvíamos nosso trabalho, em muitos momentos, tivemos a oportunidade de conviver com um servidor que passava os dias conversando e contando piadas, sem realizar nenhuma das tarefas sob sua responsabilidade no cargo ao qual estava vinculado. As justificativas dele eram de que, dentro de quatro anos ele iria se aposentar, e sendo assim, já não trabalhava mais! Esta, entre outras tantas situações ficaram marcadas em mim, num processo de amadurecimento e

percepção de mim enquanto humana e pesquisadora, e do trabalho dedicado à ciência e saúde pública ao qual eu me dispus a realizar sem limites de envolvimento. Exemplos como estes valem ser lembrados, não para repeti-los, mas sim para a reflexão de como somos diferentes e nisto está a nossa riqueza.

Seguindo perfis com abordagens em saúde pública e estudos de epidemiologia, outras investigações vêm sendo desenvolvidas pelo Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS. Entre estes, cito os trabalhos desenvolvidos na comunidade da Vila Pedreira, Esteio (RS), onde nosso Grupo de Pesquisa desenvolve estudos desde a descoberta do foco de esquistossomose em 1997 (Graeff-Teixeira et al, 1999). Nesta localidade, durante dois anos, tive a oportunidade de colaborar com o desenvolvimento de atividades de educação em saúde no Centro Municipal de Educação Básica Trindade, e na realização de coleta de sangue e urina em inquérito realizado na comunidade Vila Pedreira a partir da amostragem de escolares. Neste período, também participei da investigação de presença e coletas de *Biomphalaria* sp., para estudos de certificação de interrupção do foco de esquistossomose. Estes, entre outros dados obtidos neste estudo, estão compilados na dissertação de Mestrado da colega Angélica Ramirez (*in memoriam*), ainda não publicados.

Em adição aos estudos relacionados a diagnóstico, o período de Doutorado proporcionou-me uma incrível experiência internacional, onde pude desenvolver parte deste projeto de pesquisa no “*Natural History Museum of London*”. Nesta ocasião, sob supervisão da Dra. Bonnie Webster, desenvolvi pesquisas sobre diversidade genética de *S. mansoni* e realizei estudos sobre dispersão do parasito no Brasil. Esta experiência, sem dúvidas, é parte fundamental do meu amadurecimento e enriquecimento pessoal e profissional.

Em colaboração às experiências citadas, o desenvolvimento deste Doutorado me oportunizou participar de outros projetos de pesquisa, os quais foram únicos em termos de vivências pessoais e de crescimento científico. Em projeto coordenado pelo Dr. Martin Enk (Instituto Evandro Chagas – Pará), tive a oportunidade de participar de um estudo desenvolvido no município de Turiaçu (MA). Nesta ocasião, amostras humanas de sangue, fezes e urina foram coletadas, e métodos diagnósticos foram aplicados durante 18 dias de trabalho de campo. Em uma abordagem similar, desenvolvida sob coordenação do Dr. Stephan Geiger

(Universidade Federal de Minas Gerais), foram realizadas coletas e aplicação de métodos parasitológicos durante 15 dias na comunidade Brejo do Amparo, Januária (MG). Estas colaborações me proporcionaram o convívio com as equipes de trabalho de cada instituição, e o aprendizado de métodos, técnicas e experiências trocadas ao longo do período de trabalho compartilhado.

Em adição, muito antes dos quatro anos dedicados ao Doutorado, venho desenvolvendo atividades no Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS desde 2012, onde dedico minhas atenções especialmente à dinâmica de transmissão da esquistossomose, e ao aprimoramento de técnicas diagnósticas. Diante desta experiência, posso citar o enorme conhecimento e habilidades que desenvolvi na detecção de ovos de *S. mansoni*, especialmente com a técnica de coloração por Ninidrina. Recentemente, de acordo com os resultados demonstrados no Capítulo I desta Tese, o método Helmintex foi reconhecido por órgãos públicos de saúde como o método “Padrão Ouro” no diagnóstico da esquistossomose (Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2018). Todo conhecimento adquirido ao longo destes anos, em especial as habilidades em examinar amostras fecais e identificar ovos de *S. mansoni*, permitiram-me participar em co-autoria de alguns trabalhos desenvolvidos no Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, e em colaborações externas, a saber:

- 1) *“Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis”* (Favero et al, 2017);
- 2) *“Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test”* (Oliveira et al, 2018);
- 3) *“Criteria for identification of Schistosoma mansoni eggs in fecal sediments prepared with the Helmintex method and stained with ninyhidrin”* (Souza et al, 2018 – submetido ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, ID MIOC-2018-0529);
- 4) *“A new diagnostic strategy which uses a luminol-H₂O₂ system to detect Schistosoma mansoni eggs in fecal sediments processed by the Helmintex method”* (Favero et al, 2019 – submetido ao periódico PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, ID 2019-02255).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo I: “Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candéal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil”

- 1.1 A prevalência estimada pelo método de Kato-Katz foi de 11,9%, enquanto que pelo método Helmintex foi de 40,6%, representando 55 e 187 amostras positivas, respectivamente.
- 1.2 A prevalência demonstrada pelo teste rápido de urina POC-CCA foi de 71,6 % quando considerados os traços como positivos, e 40,6% quando considerados os traços negativos.
- 1.3 O maior número de indivíduos infectados apresentou baixa carga parasitária, sendo 187 casos positivos diagnosticados pelo método Helmintex, e destes, 131 (70%) apresentaram cargas inferiores a 1 OPG.
- 1.4 A comparação entre os métodos Kato-Katz e Helmintex apresentou 46 e 14 amostras positivas, respectivamente, contendo entre 1 e 12 OPG, enquanto 23 amostras apresentaram carga parasitária superior a 50 OPG.
- 1.5 A sensibilidade demonstrada pelo teste rápido de urina POC-CCA variou entre 57,4% e 81,9%, considerando os resultados traços como positivos, ou negativos, respectivamente. Tal incongruência reflete a inconsistência no uso deste teste para diagnóstico da esquistossomose.
- 1.6 O método Helmintex demonstrou ser o teste diagnóstico mais sensível e 100% específico descrito até o presente momento, sendo capaz de detectar infecções com sensibilidade 3 vezes superior ao método de Kato-Katz, atualmente indicado pela OMS ao diagnóstico da esquistossomose mansônica.
- 1.7 A excelência dos resultados apresentados pelo método Helmintex no grande número amostral abordado sugere a indicação do método como padrão ouro no diagnóstico da esquistossomose mansônica.

Conclusões gerais: Estudo de base populacional, envolveu 461 participantes voluntários de Candeal, Estância (SE), Brasil. A prevalência de esquistossomose foi determinada em 11% através do método de KK, 40% através do HTX, e 71% utilizando o teste POC-CCA. 70% dos indivíduos amostrados apresentaram carga parasitária inferior a 1 OPG, revelando uma dissociação entre a prevalência e intensidade de transmissão nesta localidade. Os resultados obtidos confirmam que o método Helmintex é um procedimento de detecção de ovos altamente sensível e sustentam sua utilização como método de referência para o diagnóstico de esquistossomose intestinal e para avaliação comparativa de outros testes.

Capítulo II: “Evaluating an adult microsomal antigens (MAMA) to detect *Schistosoma mansoni* infections in a highly endemic area in Candeal, Sergipe (Brazil)”

1.1 52 amostras de soro de pacientes positivos com carga parasitária inferior a 1 OPG foram analisadas. Destas, 47 apresentaram reatividade ao antígeno MAMA, enquanto que 5 amostras apresentaram resultado negativo;

1.2 36 amostras de soro de participantes positivos com carga parasitária igual ou superior a 1 OPG foram analisadas. Destas, 31 apresentaram reatividade ao antígeno MAMA, enquanto que 5 amostras foram negativas à presença do antígeno.

1.3 Os resultados demonstrados pelo antígeno MAMA apresentam maior número de casos falso-positivos em amostras com cargas parasitárias inferiores a 1 OPG, enquanto que o maior percentual de resultados falso-negativos foi apresentado nas amostras compostas por cargas parasitárias superiores a 1 OPG.

1.4 Segundo os resultados obtidos, a correlação entre falsos-positivos e falsos-negativos não aparenta estar, em análise prévia, correlacionada a carga parasitária, uma vez que nos indivíduos com maiores cargas os resultados falso-negativos foram mais expressivos.

1.5 A utilização do antígeno MAMA, atualmente considerado um dos antígenos mais específicos e sensíveis no diagnóstico da esquistossomose, apresenta sérias limitações, demonstradas a ocorrência de resultados falsos-positivos e falsos-negativos em amostras de variadas cargas parasitárias.

1.6 Fatores como dificuldade de produção, alto custo financeiro e necessidade de condições e equipe laboratorial especializada são fatores associados à limitação do uso de testes sorológicos no diagnóstico da esquistossomose, indicando-se o uso apenas em casos de triagem de pacientes suspeitos, necessitando a aplicação de outros métodos associados para confirmação da infecção por *S. mansoni*.

Conclusões gerais: 138 amostras de soros humanos previamente coletados foram utilizadas para analisar o desempenho do diagnóstico através da detecção do antígeno MAMA, através do método de Western Blot. 76,8% das amostras foi detectada por reação sorológica ao antígeno MAMA e 23,2% não apresentaram reatividade. No total, foram reconhecidos 78 casos verdadeiramente positivos, 22 verdadeiramente negativos, 10 (11,4%) falso-negativos e 28 (56%) falso-positivos, utilizando o método Helmintex como método de referência para o diagnóstico.

Capítulo III: “Genetic diversity within *Schistosoma mansoni*: DNA barcoding reveals one genetic group in Brazil”

- 1.1** Ao final das extrações e purificações de DNA, foram obtidas 47 sequências genéticas de alta qualidade, dos isolados brasileiros de Estância e Propriá (Sergipe), Januária (Minas Gerais), Sumidouro (Rio de Janeiro) e Esteio (Rio Grande do Sul), através das quais foram analisadas a diversidade genética local.
- 1.2** Foram utilizados como grupos comparativos externos, as sequências genéticas de isolados do Senegal, Nigéria, Mali, Camarões, Uganda, Quênia, Tanzânia e Zâmbia, depositados em bancos genéticos da *Schistosomiasis Collection - Natural History Museum of London*.
- 1.3** A diversidade de haplótipos entre os isolados brasileiros foi de 0,333, enquanto que o padrão de variabilidade genética entre as sequências foi de 0,215, não demonstrando variações genéticas significativas entre os isolados abordados nesta análise.
- 1.4** Foi demonstrada a ocorrência de apenas dois haplótipos entre os isolados brasileiros, sendo um composto pelas amostras originárias de Propriá e

Estância (SE), Januária (MG) e Esteio (RS) e outro pelas amostras do isolado Sumidouro (RJ).

- 1.5 As sequências de isolados do Brasil aparentam ter uma associação genética mais similar às sequências do Senegal e Nigéria, em comparação aos demais países africanos analisados, sugerindo a possível origem das linhagens brasileiras nestas regiões da África.

Conclusões gerais: Cinco isolados brasileiros de *S. mansoni* (Estados de Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul) foram utilizados para estudos de ocorrência de diversidade genética, em comparação a isolados africanos. Com uso da técnica de “*DNA barcoding*”, utilizando a variação de sequências genéticas da subunidade *cox I* do DNA mitocondrial foram identificados dois haplótipos ocorrentes entre as amostras brasileiras, sugerindo a origem dos isolados nos países africanos do Senegal e Nigéria.

PERSPECTIVAS

Diante dos resultados apresentados, as perspectivas para a continuidade das pesquisas abordadas nesta Tese estão relacionadas ao aprofundamento dos estudos sobre detecção de ovos pelo método Helmintex, através da busca de estratégias inovadoras para o aprimoramento da leitura de sedimentos fecais, visando a redução no tempo necessário à leitura dos resultados; o desenvolvimento de estudos nas regiões descritas com maior número de pessoas infectadas em Candeal, correlacionando os casos positivos às suas possíveis fontes de infecção; o acompanhamento da localidade Candeal e o desenvolvimento de medidas de saneamento básico e educação em saúde a fim de monitorar o comportamento focal; a definição dos critérios de certificação de interrupção da transmissão da esquistossomose na localidade Candeal ao longo do tempo; a avaliação sorológica dos 47 antígenos disponíveis para *S. mansoni* e a descrição dos índices de sensibilidade, utilizando como método de referência o Helmintex; a descrição da correlação entre o desempenho do antígeno MAMA e do teste rápido de urina POC-CCA na detecção da infecção por *S. mansoni*, utilizando como método de referência o Helmintex; a ampliação do número de isolados no estudo de variabilidade genética, amostrando pelo menos uma forma parasitária de cada Estado brasileiro com ocorrência natural de esquistossomose, e o desenvolvimento de análises de diferenciação entre isolados obtidos na natureza em comparação a cepas mantidas em laboratório.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br