

## Parte V - Diagnóstico

31 - Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansoni

Ana Rabello  
Luís André Pontes  
Martin Johannes Enk  
Silvia Maria Lucena Montenegro  
Clarice N. Lins de Morais

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

RABELLO, A., *et al.* Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 895-925. ISBN 978-85-7541-370-8. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

---



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

**PARTE V**

# Diagnóstico

# 31

## Diagnóstico Parasitológico, Imunológico e Molecular da Esquistossomose Mansonii

Ana Rabello  
Luís André Pontes  
Martin Johannes Enk  
Silvia Maria Lucena Montenegro  
Clarice N. Lins de Moraes

Ovo maduro de *Schistosoma mansoni*.  
Fonte: <http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/S.mansoni.egg.html>



O diagnóstico preciso da esquistossomose consiste em um instrumento-chave para aspectos importantes da infecção, como os determinantes epidemiológicos, os fatores relacionados à morbidade, as avaliações de intervenções terapêuticas e o acompanhamento de medidas de controle. Durante o século XX, embora tenham sido limitados os investimentos em métodos diagnósticos da esquistossomose, muito se alcançou, como será descrito ao longo deste capítulo. Entretanto, neste início de século XXI, o método ideal, que associe elevada eficácia, baixo custo e simplicidade operacional, ainda não está disponível. É relevante lembrar que a escassez de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da esquistossomose compõe o panorama da política de produção voltada para o mercado, deixando órfãs as doenças negligenciadas que atingem a grande maioria da população global.

## ASPECTOS HISTÓRICOS

Em 1852, quando Theodor Bilharz, médico alemão que trabalhava no Egito, descreveu pela primeira vez a doença parasitária que mais tarde se chamaria esquistossomose, apresentou também a primeira contribuição às técnicas diagnósticas da infecção: os desenhos dos ovos espiculados. Estes mesmos desenhos, ainda que revelassem um erro conceitual, constituíram o princípio teórico para a descrição da parasitose. Bilharz se enganou ao considerar os ovos de espículos terminais e os de espículos laterais como pertencentes à mesma espécie. Este conceito foi questionado por Patrick Manson (1902), que definiu a existência de espécies distintas, e foi defendido por Looss (1909), que explicava a formação dos ovos com espículo lateral como sendo consequência do excesso de células vitelinas no oótipo. A polêmica persistiu por meia década até que Sambom, em 1907, estabeleceu o nome da nova espécie: *Schistosoma mansoni*. Um ano mais tarde, Pirajá da Silva (1908) descrevia a esquistossomose mansoni na Bahia, reforçando a existência de uma espécie distinta, que provocava acometimento intestinal nos pacientes infectados e cujos ovos apresentavam espículo lateral. Em 1919, Adolpho Lutz descreveu a primeira modificação do método diagnóstico da esquistossomose: homogeneização e sedimentação das fezes.

Simultaneamente, ocorriam os avanços científicos na área do conhecimento imunológico. A reação de fixação de complemento foi desenvolvida por Bordet & Gengou em 1901, sendo aos poucos estabelecido o conceito de anticorpos (na época, denominados *amboceptors*). O método de fixação do complemento foi então aplicado para o diagnóstico do tifo abdominal e da sífilis, por Wasserman, Neisser & Bruck (1906). Baseados nesses estudos, grupos de pesquisadores japoneses (Fujinami & Nakamura, 1909; Yoshimoto, 1910; Hayami & Tanaka, 1910; Sueyasu, 1916) descreveram e testaram a primeira técnica imunológica para o diagnóstico da esquistossomose. Mais tarde, em 1919, Fairley utilizou o mesmo método, usando como antígeno hepatopâncreas de moluscos infectados, e ainda desenvolveu um teste de reação intradérmica. Em 1960, o teste de anticorpo fluorescente foi introduzido para o diagnóstico da esquistossomose mansoni (Sadun, Williams & Anderson, 1960) e alguns anos mais tarde Buck et al. (1964), na Etiópia, avaliaram o teste de fixação de complemento e o teste que utilizava anticorpo fluorescente, concluindo que o teste de fixação de complemento era a técnica mais sensível. Desde então, a utilização de técnicas de diagnóstico para a esquistossomose tem acompanhado passo a passo o desenvolvimento tecnológico médico-laboratorial mundial.

Exemplo curioso das consequências do desenvolvimento tecnológico refere-se à própria história da esquistossomose. Até 1992, a descrição mais antiga da esquistossomose cabia a Ruffer (1910), que relatou a presença de ovos calcificados nos rins de duas múmias egípcias da vigésima dinastia (1250-1000 anos antes de Cristo). Por meio da detecção de antígenos circulantes do parasito nos tecidos de múmias egípcias, sabe-se hoje que a humanidade convive com a esquistossomose desde os 3000 anos antes de Cristo (Miller et al., 1992).

## CATEGORIAS DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Neste capítulo serão abordados os métodos laboratoriais de diagnóstico da esquistossomose mansoni. Os métodos de diagnóstico da esquistossomose podem ser agrupados em duas categorias: métodos de diagnóstico direto e métodos de diagnóstico indireto. São considerados diretos os métodos que detectam

o parasito ou suas partes, como ovos, substâncias antigênicas ou fragmentos moleculares. Os métodos indiretos identificam evidências indiretas da presença do parasito e dependem de marcadores clínicos, bioquímicos ou imunológicos associados à infecção (Quadro 1).

Quadro 1 – Categorias dos métodos diagnósticos

Categoria	Métodos	Deteção de
Diretos	Exame de fezes ou biópsia de mucosa retal	Ovos eliminados pelas fêmeas
	Pesquisa de antígenos circulantes	Substâncias antigênicas presentes em tegumento ou material de regurgitação
	Reação em cadeia da polimerase	DNA de ovos, tegumento ou material de regurgitação
Indiretos	Clínicos: sintomas e sinais	Diarréia, sangue nas fezes, hepatoesplenomegalia
	Propedêutica clínica	Alterações ultra-sonográficas e hemodinâmicas
	Imunológicos: reação intradérmica	Imunidade celular específica
	Imunológicos: sorológicos	Imunidade humoral específica

### Métodos Diretos: exame parasitológico de fezes

O diagnóstico da infecção por *S. mansoni* por meio de métodos parasitológicos ou coproscópicos é baseado na observação microscópica dos ovos dos parasitos nas fezes. Este conjunto de métodos permanece como o instrumento mais largamente utilizado, principalmente por seu baixo custo operacional e sua praticidade em situações de infra-estrutura laboratorial precária.

### Técnicas Qualitativas e Quantitativas

As técnicas coproscópicas se dividem em dois grupos. O primeiro abrange técnicas qualitativas que somente informam a presença ou ausência de ovos do parasito. O segundo grupo se compõe de técnicas quantitativas que, além de detectarem a presença do parasito, determinam o número de ovos por grama de fezes do material examinado.

Os exames qualitativos podem ser realizados com mais facilidade e mais rapidamente, porém os exames quantitativos permitem estimar a carga parasitária e realizar projeções sobre a dinâmica da infecção, especialmente em comunidades. Mediante a determinação da distribuição média do número de ovos por grama de fezes, que reflete a carga parasitária de um grupo populacional, é possível obter indicadores epidemiológicos utilizados em programas de controle (Quadro 2).

Um exemplo desta importância é a avaliação dos resultados alcançados com as medidas de controle implementadas em determinada região endêmica, que podem se mostrar reduzidos se baseados exclusivamente na determinação da prevalência, mas podem revelar importantes repercussões ocorridas na intensidade da infecção na população tratada (OMS, 1994).

Quadro 2 – Indicadores epidemiológicos que podem ser obtidos pelo uso de métodos quantitativos e exemplos de utilização destas informações

Indicadores Epidemiológicos	Exemplos de Utilidade
Intensidade da infecção	Definição de estratégia de tratamento e controle em área endêmica
Fatores associados ao risco de infecção ou de adoecimento	Identificação de grupos populacionais mais vulneráveis à infecção, como crianças ou trabalhadores rurais
Intensidade de morbidade	Permite a definição da estratégia de tratamento e a necessidade de reavaliações mais freqüentes de grupos populacionais mais parasitados
Impacto da terapêutica sobre a redução de parasitos em uma comunidade	Possibilita avaliar o percentual de redução de ovos eliminados nas fezes em uma população após diferentes estratégias de controle
Avaliação da quimioterapia ou possível resistência a drogas	O exame qualitativo pode persistir positivo, mas a quantificação permite avaliar se a droga foi parcialmente ativa
Comparação de dados entre áreas endêmicas	A determinação da carga parasitária permite entender diferenças entre morbidade, fatores associados à infecção e resposta terapêutica de diferentes estudos

## DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

### Técnicas Parasitológicas Qualitativas

Inúmeras técnicas qualitativas encontram-se descritas na literatura científica. Algumas técnicas já não são utilizadas para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose e serão brevemente mencionadas para informação ao leitor. São exemplos os exames diretos do material fecal em lâmina, sem preparação, que não são considerados adequados à pesquisa de ovos de *S. mansoni* por sua baixa sensibilidade (Hoffmann, Pons & Janer, 1934; Martins, 1937). Também as técnicas de flutuação (Willis, 1921; Faust et al., 1939) não são úteis à identificação dos ovos de *S. mansoni*, por estes serem pesados. Métodos de centrifugação (Faust, Ingalls & See, 1946; Sapero & Lawless, 1953; Blagg et al., 1955) apresentam baixa sensibilidade no diagnóstico da esquistossomose. Já a técnica de eclosão de miracídeos é um método sensível, sendo principalmente indicado para a demonstração de viabilidade dos ovos do parasito em ensaios de drogas, mas não encontra aplicação prática, no diagnóstico da doença, por sua complexidade.

#### Sedimentação Espontânea das Fezes (Lutz/HPJ)

O método de sedimentação espontânea das fezes foi descrito por Lutz (1919) e padronizado por Hoffmann, Pons & Janer (1934), tornando-se conhecido como método de Lutz/HPJ. Neste procedimento, fezes suspensas em água são homogeneizadas e filtradas em tela metálica, para retenção de resíduos fecais de maiores dimensões, e deixadas a sedimentar, espontaneamente, por duas horas ou mais. A seguir, amostra do material depositado é examinada em microscópio ótico, entre lâmina e lamínula. Modificações do líquido diluidor, tempo e número de lavagens e substituição da tela metálica por gaze cirúrgica foram propostas com o objetivo de eliminar inconvenientes, como turvação do sedimento e necessidade de repetidas lavagens da tela metálica. Martins (1949), em revisão minuciosa da técnica, conclui ser o trítion NE 0,1% (solução de polietilenoglicol mono-isso-octil-éter) o líquido diluidor que oferece preparações mais claras, que a tela metálica é superior à gaze cirúrgica, por reter quatro vezes

menos ovos em suas malhas, e que a sedimentação ideal é feita em três etapas sucessivas de noventa, sessenta e trinta minutos.

Este é o método qualitativo mais difundido entre os laboratórios de análises clínicas, por ser de fácil execução e baixo custo, apresentar boa sensibilidade, não exigir aparelhagem especial e permitir o diagnóstico simultâneo de outras parasitoses.

#### Técnica do Formol-éter

Modificada por Knight et al. (1976), a técnica do formol-éter é mais usada no hemisfério Norte como uma alternativa para o método de sedimentação anteriormente mencionado. Em resumo, aproximadamente 1 g de fezes é emulsificado em solução de formol-água. A suspensão é coada e o éter é adicionado. Após centrifugação da suspensão, o sedimento é examinado com auxílio de um microscópio. Esta técnica alcança valores relativamente altos de sensibilidade para análises qualitativas (Engels et al., 1997). Além do diagnóstico da esquistossomose, este método permite o diagnóstico de outras infecções helmínticas e de protozoários. Infelizmente, a técnica é bastante trabalhosa e o risco do manuseio dos reagentes químicos são fatores limitantes de sua utilização, especialmente em condições de campo.

#### Técnicas Parasitológicas Quantitativas

Entre os métodos parasitológicos quantitativos encontram-se os de Bell (1963), de Barbosa (1965) e o mais utilizado, o de Kato, modificado por Katz, Chaves & Pellegrino (1972).

#### Método de Bell

Baseia-se na filtração de emulsão de quantidade (peso) conhecida de fezes, por duas telas finas (malhas de 500 e 350 micra) e posteriormente por papel de filtro, onde os ovos de *S. mansoni* ficam retidos. A seguir, acrescenta-se uma gota de solução saturada de ninidrina ao papel de filtro, com a finalidade de corar e facilitar a visualização dos ovos mediante exame microscópico. Este método não tem sido utilizado com frequência, porque é de execução pouco prática.

#### Método de Barbosa

É uma técnica relativamente mais simples e econômica para o diagnóstico da esquistossomose mansoni. Cinco gramas de fezes são emulsionados em 25 ml de água. Após filtração da emulsão em gaze, o sedimento é colhido em frasco adequado e deixado a sedimentar por sessenta minutos. A seguir, despreza-se o sobrenadante e o volume do sedimento é medido. Com uma pipeta e mantendo o sedimento sob agitação constante, retira-se alíquota de 1 ml e examina-se ao microscópio, contando os ovos presentes. O cálculo para obtenção do número de ovos por grama de fezes é realizado com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Números de ovos por lâmina} \times \text{volume do sedimento}}{\text{Volume examinado} \times \text{peso da amostra de fezes}}$$

A desvantagem deste método é sua baixa sensibilidade e a variação do volume do sedimento, prejudicando o resultado quantitativo. Sendo assim, o método tem pouca validade quando se trata de inquéritos epidemiológicos.

### Método de Kato Modificado por Katz, Chaves e Pellegrino

Mais conhecido como método de Kato-Katz, esta técnica apresenta sensibilidade similar, ou melhor, do que os demais procedimentos quantitativos, com a vantagem da simplicidade de execução, do baixo custo e da possibilidade do armazenamento e transporte das lâminas em temperatura ambiente por meses, sem prejuízo dos resultados. O método permite o diagnóstico de outros helmintos, exceto de larvas de *Strongyloides* sp.

Em 1972, Katz, Chaves & Pellegrino modificaram o método anteriormente descrito em japonês por Kato & Miura (1954) e posteriormente aperfeiçoado por Kato (1960), simplificando a realização da técnica quantitativa, por tornar desnecessária a pesagem prévia da amostra de fezes. Aqueles autores utilizaram um pequeno retângulo de papelão (4 x 3 cm) com espessura de 1,37 mm, dotado de orifício de 6 mm de diâmetro em seu centro, para medir a quantidade de fezes a ser examinada. Colocando o cartão sobre uma lâmina de microscópio e preenchendo o orifício com fezes, auxiliado por um palito, após passá-las através de malha quadrada de 200 micra, obtém-se amostra que, em média, pesa 43,7 mg, com variações compreendidas entre 42,5 e 45,4 mg. As fezes obtidas são espalhadas sobre lâmina de vidro e cobertas com lamínula de celofane, previamente tratada durante 24 horas com solução de glicerina, água destilada e verde malaquita ou azul de metileno. Após a evaporação da água, a glicerina atua sobre o esfregaço das fezes, clarificando e permitindo a visualização dos ovos por exame microscópico. Para calcular o número de ovos contidos em 1 g de fezes, pode-se admitir que toda lâmina contenha 45 mg de fezes e, para se obter o resultado final aproximado, multiplica-se por 24 o número total de ovos encontrados na lâmina.

Atualmente, estão disponíveis *kits* de material plástico descartável, que permite que a técnica seja executada com maior biossegurança. Neste capítulo podem ser encontradas a descrição da realização do método de Kato-Katz e a ilustração do aspecto microscópico dos ovos.

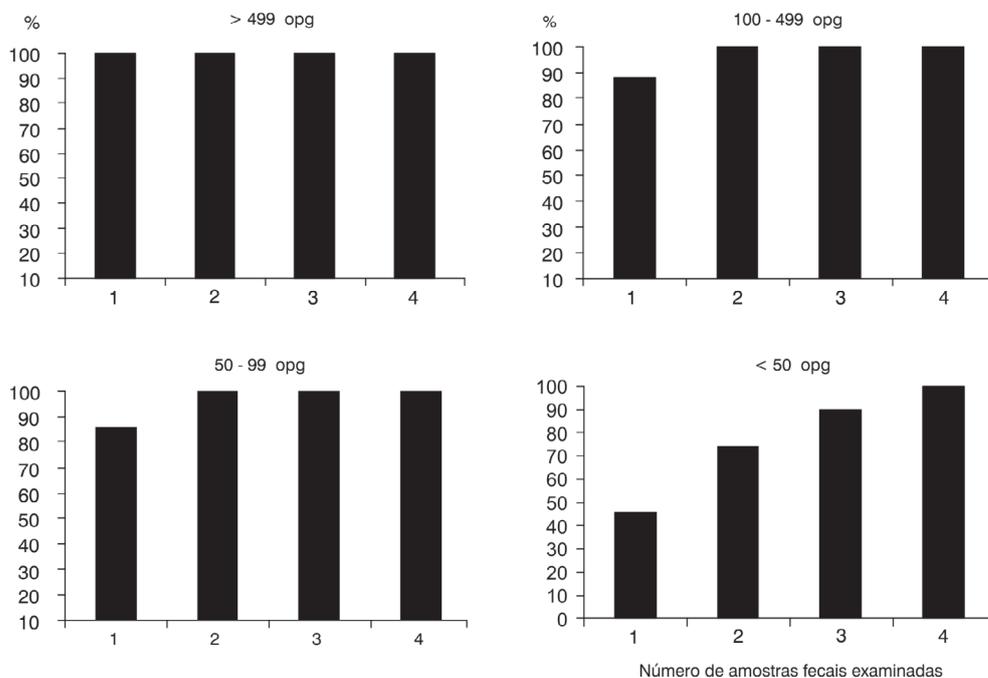
Um fator limitante do método de Kato-Katz está relacionado à consistência das fezes e conseqüentemente à quantificação da excreção de ovos (Bell, 1963; Bout, Santoro & Capron, 1975; Hoshino-Shimizu et al., 1986). Como o cálculo do número de ovos por grama está sendo baseado na suposição de que a densidade das fezes é igual a um – porque a placa perfurada determina volume definido e não peso – uma amostra de fezes seca pode ter uma contagem de ovos até sete vezes maior que uma amostra úmida obtida do mesmo indivíduo (Hagan & Abath, 1992). Além disto, fezes líquidas, que podem estar associadas à esquistossomose, não podem ser processadas por este método (Jassim, Catty & Hassan, 1987). Outros fatores que limitam a precisão da quantificação dos ovos nas fezes são a flutuação diária na eliminação dos ovos e a distribuição desigual de ovos nas fezes (Barreto, Smith & Sleight, 1990; De Vlas et al., 1997; Engels et al., 1997).

O método de Kato-Katz é o procedimento internacionalmente recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1994) para o diagnóstico de *S. mansoni*, porque associa o melhor custo-benefício à maior praticidade.

A intensidade da infecção ou carga parasitária é definida pelo número de casais de vermes que parasitam o hospedeiro definitivo e está relacionada diretamente com o número de ovos nas fezes, exceto em presença de fibrose intestinal e de imunodeficiência, situações que prejudicam a extrusão dos ovos da mucosa intestinal. Quanto maior o número de casais de vermes, maior será o número de ovos encontrados nas fezes. Quando a carga parasitária é de intensidade moderada (100 a 500 ovos/grama de fezes) a

elevada (acima de 500 ovos/grama de fezes), as técnicas de diagnóstico parasitológico apresentam resultados satisfatórios. Em casos de cargas parasitárias baixas, as técnicas apresentam limitações. Estima-se que aproximadamente 200 ovos por casal, por dia, são eliminados em 200 g de fezes por dia. Apenas uma pequena amostra de 42 mg de fezes é examinada por esta técnica, sendo que a probabilidade de se detectar ovos diminui significativamente em casos de baixa intensidade de infecção. A probabilidade de se detectar uma infecção com um só casal de vermes por exame de uma só lâmina, pelo método de Kato-Katz, será de aproximadamente 1/24. Esta limitação, que afeta especialmente métodos quantitativos, pode ser superada pelo aumento do número de amostras (coleta de amostras de fezes em dias consecutivos) e também pelo aumento do número de lâminas examinadas por amostra (duas a três lâminas). Este procedimento é de grande importância na determinação de taxas de cura e na avaliação de drogas esquistossomicidas, quando se espera abrupto declínio na intensidade da infecção e conseqüentemente na quantidade de ovos eliminados nas fezes. Infecções com menos do que 50-100 ovos por grama de fezes podem não ser detectadas e resultarem em superestimativa de taxas de cura de drogas esquistossomicidas. De novo, a alternativa para aumentar a sensibilidade deste método é aumentar a quantidade do material examinado, isto é, aumentando o número de amostras e de lâminas por amostra. Estas considerações teóricas foram exaustivamente confirmadas na prática e por estudos no campo (Barker et al., 1992; Barreto, Smith & Sleight, 1990; Bell, 1963; Kagan, 1955; Kanamura et al., 1979). Na Figura 1 é demonstrado o efeito do aumento do número de amostras de fezes examinadas na sensibilidade do método de Kato-Katz, com diferentes cargas parasitárias.

Figura 1 – Efeito do aumento do número de amostras de fezes examinadas na sensibilidade do método de Kato-Katz\*



\* Em diferentes cargas parasitárias o aumento do número de amostras de fezes é principalmente observado em indivíduos eliminando menos de cem ovos por grama de fezes.

Fonte: Rabello (1990).

### Biópsia da Mucosa Retal

A biópsia da mucosa retal constitui um procedimento invasivo, em que se retira, por retoscopia e biópsia, um fragmento de mucosa retal, para exame microscópico e verificação da presença de ovos. O método foi descrito por Ottolina & Atêncio, em 1943. Cançado et al., em 1965, introduziram o oograma quantitativo, método ainda usado para avaliações de atividade de drogas, que permite a classificação dos ovos (imaturos, maduros, mortos) e a demonstração rápida de modificações da oviposição.

Quando a escolha do método de diagnóstico da esquistossomose objetiva a avaliação individual de pacientes, a demonstração dos ovos do parasito em fragmentos de mucosa retal é, algumas vezes, considerada. A respeito desta técnica vale enfatizar:

- se padronizado o critério de positividade como presença de ovos viáveis no tecido retal, e se garantida a qualidade técnica do examinador das amostras fecais e do oograma, dois exames de fezes pelo método Kato-Katz apresentam a mesma sensibilidade que o oograma obtido via biópsia retal;
- devido à significativa e positiva correlação entre o número de ovos observado no tecido retal e nas fezes, a concordância entre os dois métodos é de 100% quando o paciente apresenta mais de 200 ovos por grama de fezes e mais do que dois mil ovos por grama de mucosa retal. As discordâncias são observadas nas infecções menos intensas (Rabello, 1990);
- atualmente, a indicação da biópsia retal para o diagnóstico da esquistossomose mansonii restringe-se ao ensaio de drogas, pela demonstração precoce de modificações no oograma retal.

A dependência de pessoal treinado e o desconforto para o paciente limitam este método ao uso antes descrito.

Para o diagnóstico individual a escolha de procedimentos de detecção mais sensíveis pode trazer vantagens, apesar de serem de execução mais trabalhosa. Como os sinais e sintomas de uma infecção por *S. mansonii* não são específicos, métodos que detectam ovos de outros helmintos e também cistos e trofozoítos de protozoários intestinais podem estar indicados. Técnicas que preenchem estes requisitos e que são usadas no dia-a-dia dos laboratórios incluem os métodos de Lutz/HPJ e o de formol-éter, mencionados anteriormente.

## DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

### Aspectos Gerais

Existe uma ampla variedade de testes imunológicos; entretanto, eles apresentam valor limitado no diagnóstico da esquistossomose. Os métodos disponíveis apresentam reações cruzadas com outras helmintoses, não detectam a intensidade da infecção, não diferenciam infecção passada e recente e podem permanecer positivos durante anos após a cura quimioterápica (Smithers & Doenhoff, 1982; Mott & Dixon, 1982; Montenegro, 1992). Portanto, até o momento, não parece existir nenhuma técnica imunodiagnóstica com as características ideais, que são: efetividade, utilização de poucos reagentes, baixo custo, uso de equipamentos simples, rapidez na execução e facilidade de realização no campo (Rabello, 1997). De modo geral, grande número de estudos relacionados à utilização de métodos imunológicos de detecção da reação

antígeno/anticorpo para o diagnóstico da esquistossomose consiste em demonstração prática, não sendo os métodos usados de modo efetivo. Esses métodos imunológicos permanecem na etapa de pesquisa laboratorial, sendo experimentalmente utilizados para o estudo da relação hospedeiro/parasito.

A maior parte dos métodos sorológicos descritos para o diagnóstico da esquistossomose são indiretos e se aplicam à detecção de anticorpos. A positividade em um desses métodos não define a presença de infecção esquistossomótica ativa, pois somente indica resposta do sistema imune do hospedeiro a determinados antígenos parasitários. Devido às limitações dos métodos parasitológicos mencionados anteriormente, vários autores (Rey, 2001; Coelho & Tavares, 1991) salientam que os métodos imunológicos são justificados em algumas situações, como áreas endêmicas de baixa intensidade de infecção (estimada pelo número de ovos nas fezes), onde é baixa a eficiência dos exames parasitológicos. Os testes imunológicos têm sido usados principalmente como métodos auxiliares em levantamentos epidemiológicos e para o controle de cura (Bergquist, 1992).

A elevada sensibilidade dos métodos de detecção de anticorpos estimula seu uso para o diagnóstico da esquistossomose e isso se aplica não somente a pessoas que vivem em áreas endêmicas, mas principalmente a turistas que retornam infectados para seus países, não endêmicos para a esquistossomose (Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004). Devido à persistência de anticorpos após o tratamento específico da infecção, os métodos de detecção de anticorpos são inadequados para o monitoramento de cura quimioterápica (Bergquist, 1992).

### Técnicas Utilizadas

Os ensaios imunológicos podem detectar anticorpos produzidos pelo homem contra o parasito (métodos indiretos) ou antígenos liberados de diversos estágios do parasito e que se encontram na corrente sanguínea do hospedeiro (métodos diretos) (Bergquist, 1992).

Quadro 3 – Classificação das técnicas imunológicas utilizadas para o diagnóstico da esquistossomose

Métodos	Técnicas imunológicas
Direto Detecção de antígenos do parasito	Técnica Imunoenzimática (Elisa) de captura
Indiretos Detecção de resposta imune do hospedeiro	Reação intradérmica
	Reação pericercariana
	Teste de aglutinação cercariana
	Reação de imobilização do miracídio
	Reação de hemaglutinação indireta
	Reação de fixação de complemento
	Reação periovular ou circum-ovular
	Reação de imunofluorescência indireta
	Radioimunoensaio
Técnica imunoenzimática (Elisa)	

Fonte: adaptado de Coelho & Tavares (1991).

## Reação Intradérmica

A reação intradérmica, que é baseada na reação de hipersensibilidade imediata do tipo I ou anafilática, torna-se positiva quatro a oito semanas após a infecção. A leitura do teste é feita 15-20 min após a inoculação do antígeno e o teste é positivo quando ocorre pápula de diâmetro superior a 1 cm (ou área superior a 1,2 cm<sup>2</sup>) (Rey, 2001). Uma variedade de antígenos, de diferentes estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*, tem sido usada, mas em geral os extratos de vermes adultos propiciam reações mais sensíveis do que os de cercárias e ovos. Essa reação apresenta sensibilidade de 95% em indivíduos do sexo masculino maiores de vinte anos e de 65% em crianças e jovens do sexo feminino. Reações cruzadas podem ocorrer em pacientes infectados com *Fasciola hepatica* ou outros trematódeos e em portadores de dermatites (Coelho & Tavares, 1991). Outra limitação dessa técnica é a persistência de positividade após o tratamento e a possibilidade de sensibilização de pacientes com resposta inicial negativa, que passam a apresentar resposta falso-positiva (Rey, 2001; Coelho & Tavares, 1991). Em síntese, a técnica oferece baixas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção esquistossomótica em atividade, e seu uso deve ser desencorajado (Bergquist, 1992).

## Diagnóstico Sorológico: detecção de anticorpos

### Técnicas em Desuso

Algumas técnicas sorológicas também estão em desuso, como a reação pericercariana, a reação de aglutinação cercariana, a reação de imobilização do miracídio, a reação de hemaglutinação indireta e a reação de fixação de complemento, comentadas a seguir, por constituírem curiosidade científica ou por sua importância histórica.

Vogel & Minning (1949) descreveram a reação pericercariana, observando que, ao se colocar em contato cercárias de *S. mansoni* ou *S. japonicum* e soro de macacos infectados com *S. mansoni*, formava-se uma membrana transparente em torno das cercárias. Esse efeito foi chamado de *cercarien-hullen reaction* ou reação do envelope cercariano e serviu como base para a aplicação do método ao diagnóstico da esquistossomose. Essa reação torna-se positiva a partir da quarta semana, antes do aparecimento dos ovos nas fezes. No entanto, a técnica apresenta limitações de ordem prática, uma vez que necessita de cercárias vivas (Coelho & Tavares, 1991).

Em 1950, Liu & Bang observaram que soros inativados de macacos infectados com *S. mansoni* tinham a propriedade de aglutinar cercárias vivas. Esse fenômeno de aglutinação cercariana condicionava-se à existência de um meio desfavorável às cercárias, ocorrendo quando o soro era diluído com salina, resultando em perda de motilidade das cercárias. A positividade desse teste coincide com a época do surgimento de ovos do parasito nas fezes do paciente. A sensibilidade na fase aguda da doença é de 100%, entretanto, na fase crônica, cai para 6,1% (Coelho & Tavares, 1991). As limitações dessa técnica envolvem sua baixa sensibilidade na fase crônica da doença e a necessidade de cercárias vivas.

A reação de imobilização do miracídio foi descrita em 1953, por Senterfit, que observou paralisia do movimento ciliar do miracídio quando em contato com soro humano imune inativado. Essa técnica tem baixa sensibilidade e a obtenção dos miracídios é bastante complexa (Coelho & Tavares, 1991).

A reação de hemaglutinação indireta foi descrita para o diagnóstico da esquistossomose por Kagan (1955) e consiste na aglutinação de hemácias de carneiro adsorvidas com antígenos de *S. mansoni* quando em contato com soro imune. Essa reação apresenta sensibilidade entre 17% e 93% e especificidade de 88% (Coelho & Tavares, 1991).

Na reação de fixação de complemento, os anticorpos estão presentes desde a terceira semana de parasitismo, antes mesmo que surjam os ovos de *S. mansoni* nas fezes do paciente. Portanto, esse teste permite a detecção da infecção antes que os vermes adultos atinjam a maturidade e produzam ovos (Minning, 1941). A realização da técnica é considerada complexa e requer pessoal técnico especializado. Além disso, existem dificuldades para sua utilização no campo, pois exige a execução imediata do teste após a coleta do sangue, para que não ocorra o desenvolvimento de anticorpos contra o complemento, fazendo com que o teste perca a sua eficiência. Nos casos crônicos com mais de dez anos de evolução, essa reação apresenta menor sensibilidade (Rey, 2001).

#### Reação Periovular

A reação periovular foi descrita por Oliver-Gonzalez, em 1954. Trata-se da formação de precipitado hialino com forma globosa ou alongada que ocorre em torno de ovos de *S. mansoni* quando incubados a 37°C com soro inativado de pacientes infectados. A reação foi denominada pelos autores *circumoval precipitin test* (Copt), é visualizada após duas horas de incubação, é espécie-específica, isto é, não há reação cruzada com o soro de indivíduos infectados com espécies diferentes de *Schistosoma*, e apresenta sensibilidade de 80%-100%, sendo maior na fase crônica do que na fase aguda (Mott & Dixon, 1982; Montenegro, 1992). Suas principais limitações decorrem da dificuldade de padronização dos ovos, da ausência de quantificação e da subjetividade da interpretação visual da reação. Na Venezuela, a reação periovular apresenta sensibilidade de 92% a 100% e especificidade de 96% a 100%, sendo utilizada como padrão-ouro em áreas de baixa transmissão, recomendada como teste confirmatório devido ao fato de ser de realização complexa (Noya et al., 2002). Hillyer & Rivera-Marrero (1982) demonstraram que há um componente antigênico principal responsável pela reação periovular, denominado antígeno MSA1.

#### Reação de Imunofluorescência Indireta

Na reação de imunofluorescência indireta, o princípio é a ligação de imunoglobulinas na superfície das formas evolutivas parasitárias e na ligação posterior de antiimunoglobulinas humanas marcadas com fluoresceína (Sadun, Williams & Anderson, 1960), visualizando-se a fluorescência em microscópio apropriado. Esse método apresenta sensibilidade equivalente à fixação de complemento, mas é menos específico (Coelho & Tavares, 1991). A necessidade de microscópio de fluorescência limita a utilização do método em áreas endêmicas com pouca infra-estrutura.

#### Radioimunoensaio

O teste de radioimunoensaio (RIE) utiliza o  $I^{125}$ , tem o mesmo princípio da imunofluorescência e dos testes imunoenzimáticos, mas apresenta desvantagens pelo uso de material radioativo, de aparelhos especializados e por, seu custo operacional ser muito alto. Neste teste, o antígeno MSA1, uma glicoproteína de peso molecular de 137 kDa, mostrou-se altamente específico para o diagnóstico da esquistossomose mansoni (Stek et al., 1985).

## Elisa

Atualmente a técnica mais utilizada, o método imunoenzimático *enzyme linked immunosorbent assay* (Elisa), foi introduzido em 1971 por um grupo sueco (Engvall, Jonsson & Perlmann, 1971) e outro holandês (Van Weemen & Schuur, 1971). A técnica utiliza enzimas ligadas a antígenos ou anticorpos para detecção de anticorpos ou antígenos, respectivamente. Sua adaptação para o uso em placas de microtitulação foi descrita por Voller, Bartlett & Bidwell (1976) e possibilitou seu uso com menores volumes de reagentes, mais estáveis e mais econômicos.

Algumas derivações surgiram a partir do Elisa, como o dot-Elisa (Pappas, Hajkowski & Hockmeyer, 1983) e o dot-DIA (*dot dye immunoassay*) (Snowden & Hommel, 1991; Rabello et al., 1992), e outros estudos desenvolveram diferentes suportes para a realização da técnica (Montenegro et al., 1999; Coelho et al., 2002).

Uma das dificuldades iniciais no desenvolvimento de testes sorológicos é a escolha dos antígenos apropriados. Existem diversas dificuldades que influenciam a escolha de um antígeno ideal, como: produtividade e facilidade de obtenção, elevada estabilidade em condições simples de estocagem, capacidade antigênica, especificidade e compatibilidade com técnicas sorológicas baratas e simples. Os antígenos podem ser obtidos de diversos estágios evolutivos de *S. mansoni*, podendo ser proteínas, polissacarídeos e enzimas. Os mais usados são os extratos brutos, preparados mediante ruptura de vermes, larvas ou ovos. O antígeno solúvel de vermes adultos de *S. mansoni*, *soluble worm adult protein* (Swap) é a fonte mais fácil e abundante de material antigênico (Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004). O homogeneizado de ovos de *Schistosoma*, conhecido como antígeno solúvel de ovo (*soluble egg antigen* – SEA), contém grande número de frações antigênicas, apesar de somente a minoria desses constituintes serem liberados por ovos viáveis, como demonstrado por Ashton et al. (2001). Estas observações sugerem que a reação antígeno-anticorpo depende de número limitado de antígenos incluídos no SEA. Portanto, o uso de preparações de antígenos purificados é uma possibilidade, uma vez que soros de pacientes infectados reagem principalmente com as frações antigênicas 30 kDa, denominado  $\omega$ -1; 36-41 kDa, chamado  $\alpha$ -1, e a fração > 90 kDa, conhecida também como k-5. Os antígenos  $\omega$ -1 e  $\alpha$ -1 constituem a fração do antígeno CEF6 (*cathionic egg fraction* 6), os quais podem ser purificados com utilização do método de cromatografia (Dunne et al., 1984). Antígenos de cercárias são menos freqüentemente empregados por causa de sua baixa sensibilidade e especificidade, quando comparados aos antígenos de verme adulto e ovos (Lunde & Ottensen, 1980). Uma modificação no preparo de antígenos de ovos para uso em Elisa foi relatada por Alarcon de Noya et al. (2000) que, pela eliminação de carboidratos, obtiveram especificidade de 97%.

Como já mencionado, um dos grandes problemas da pesquisa de anticorpos é a ocorrência de reações cruzadas, principalmente observadas com o uso de antígenos brutos, que contêm frações antigênicas compartilhadas com diversos parasitos, como também com alguns protozoários e bactérias. Por essa razão, na década de 1980, as pesquisas concentraram-se em identificar preparações de antígenos imunoquimicamente purificados, que induzissem a formação de anticorpos mais específicos do que os existentes, utilizando diversas técnicas imunológicas, principalmente Elisa. São exemplos de antígenos mais estudados o *major serological antigen* (MSA), sobretudo o MSA1 de 137 kDa e o antígeno CEF6, que são frações antigênicas de ovos, e os antígenos *adult microsomal antigen* (Mama) e 31/32 kDa (associados ao intestino), que são antígenos de vermes adultos. Um antígeno larval de 37 kDa, de *S. mansoni*, tem atraído interesse dos pesquisadores, devido ao seu uso como marcador de susceptibilidade à infecção (Wu, 2002).

Outro inconveniente do imunodiagnóstico por detecção de anticorpos é a persistência de resposta humoral após a cura quimioterápica. O antígeno purificado CEF6 parece constituir uma alternativa, produzindo redução dos níveis de anticorpos após seis meses de tratamento quimioterápico (Mott & Dixon, 1982; Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004).

O desenvolvimento da tecnologia, coincidindo com os avanços da biologia molecular nas últimas décadas, proporcionou a produção de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos que parecem oferecer uma perspectiva de identificação de epítomos específicos de infecção ativa, diminuindo também a ocorrência de reações cruzadas. Recentemente, um sistema de expressão bacteriana tem sido usado para produzir uma forma recombinante de um fator de interleucina-4 (IL-4), indutor de ovos de *S. mansoni* (Ipse), que leva os basófilos a degranularem durante cultura *in vitro*. O Ipse parece ser o mesmo antígeno  $\alpha$ -1 do CEF6 e o potencial desse antígeno no diagnóstico da esquistossomose está em estudo (Schramm et al., 2003). No entanto, existem algumas dificuldades no uso desse sistema de expressão bacteriana na produção de antígenos recombinantes porque não serão glicosilados e não estarão na sua conformação nativa. Além disto, a especificidade poderá estar comprometida, se esses antígenos recombinantes não puderem ser separados de outros constituintes de células bacterianas, para os quais os pacientes já podem ter anticorpos. Para tentar resolver esses problemas, é possível utilizar células de linhagem eucarióticas ou síntese enzimática para produzir glicoconjugados, combinações de tampões para facilitar a configuração nativa da proteína e a expressão de proteínas marcadas com histidina, o que facilita a purificação (Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004).

#### Detecção de Antígenos Circulantes

A existência de antígenos circulantes de *Schistosoma* sp. foi descrita por Okabe & Tanaka (1958). Os métodos para detectá-los geralmente envolvem captura do antígeno por intermédio do Elisa tipo 'sanduíche', utilizando anticorpos dirigidos a epítomos repetitivos. No entanto, as técnicas passaram a oferecer maior sensibilidade quando a produção de anticorpos monoclonais favoreceu o processo de captura.

A presença de antígenos parasitários circulantes, que se correlaciona diretamente com o número de vermes vivos na corrente sanguínea de indivíduos infectados por *S. mansoni*, permite adequada diferenciação entre infecção passada e infecção presente (Bergquist, 1992), levando à evidência direta de infecção ativa (Doenhoff, Chiodini & Hamilton, 2004). A elevada especificidade da detecção de antígenos circulantes, pela ausência de reações cruzadas com outros parasitos e pelo desaparecimento rápido após o tratamento específico, constitui a principal vantagem deste método. Realmente, uma redução de 90% nos níveis de antígenos de intestino de vermes adultos circulantes no soro foi observada dez dias após o tratamento eficaz da infecção (De Jonge et al., 1989) ou deixaram de ser detectados seis semanas após o tratamento (Van Lieshout et al., 1991). Além disto, os níveis de antígenos circulantes geralmente se correlacionam com a intensidade da infecção e o número de ovos excretados (Polman et al., 2001).

A principal desvantagem do método, entretanto, é que ele não oferece maior sensibilidade do que o exame de fezes, em situações de baixa prevalência e de baixa carga parasitária. Por exemplo, em populações do Burundi e do Zaire, sensibilidades de 59,6% e 66,7% foram observadas nas pessoas com menos do que cem ovos por grama de fezes (De Jonge et al., 1988). Como parte de estudo multicêntrico incluindo áreas endêmicas de Minas Gerais, demonstrou-se não haver diferença significativa, em 116 pessoas, na positividade de um (46,6%), dois (52,6%) ou três (59,5%) exames de fezes e na detecção de

antígeno circulante anódico no sangue (54,3%), e que casos discrepantes são predominantemente observados em pacientes com baixa eliminação de ovos nas fezes e níveis baixos de antígenos circulantes (dados não publicados).

Diversas técnicas de detecção de antígenos circulantes foram descritas nas últimas três décadas (Ripert et al., 1988; Li et al., 1994; Cesari et al., 1998; Hassan et al., 1999); no entanto, dois antígenos têm sido mais investigados, o *circulating anodic antigen* (CAA), que é um antígeno de 70 kDa, composto por glicoproteínas presentes no intestino do verme adulto, e o *circulating catodic antigen* (CCA), polissacarídeo conhecido como 'antígeno M' e também presente no intestino do verme adulto. Esses antígenos circulantes, CCA e CAA, têm sido encontrados no soro e na urina de pacientes e animais infectados por *S. mansoni* (Disch et al., 1997; Polman et al., 1998). Alguns autores têm mostrado que o CCA é mais abundante na urina do que o CAA, porque o antígeno CCA apresenta maior filtração renal, devido ao seu tamanho e a sua polaridade, fazendo com que ele seja o candidato mais adequado para a detecção de antígenos na urina de pacientes. Estudo realizado por Disch et al. (1997) mostra que há menor variação diária de quantidades de CCA eliminadas na urina do que na eliminação diária de ovos nas fezes. Portanto, para estudos epidemiológicos, a detecção do antígeno CCA na urina através de Elisa parece ser um instrumento adequado e uma alternativa para os testes diagnósticos sorológicos. O antígeno CCA é mais frequentemente encontrado em pacientes com a forma crônica hepatoesplênica (100%) do que intestinal crônica (72%), mas somente 52% dos pacientes com a forma clínica aguda apresentavam níveis detectáveis deste antígeno (Silva et al., 1999). A detecção de antígenos circulantes não é espécie-específica, devido à presença compartilhada de antígenos entre as diversas espécies de *Schistosoma*.

#### Diagnóstico da Forma Neurológica da Esquistossomose

A mielorradiculopatia esquistossomótica é a forma ectópica mais grave e incapacitante da infecção por *S. mansoni*. Seu diagnóstico baseia-se na presença de sintomas neurológicos decorrentes de lesões da medula espinhal torácica baixa e/ou lombar, pela demonstração da infecção esquistossomótica por técnicas microscópicas ou sorológicas e na exclusão de outras causas de mielite transversa (Silva et al., 2004).

A detecção de anticorpos anti-*Schistosoma* utilizando-se as técnicas de Elisa e/ou imunofluorescência indireta tem sido utilizada para auxiliar o diagnóstico. A positividade da sorologia para *Schistosoma* no líquido cefalorraquidiano é questionada, devido à falta de uniformidade na padronização do método, à inexistência de estudo que comprove sua acurácia e à possibilidade de que a sorologia líquórica positiva possa representar apenas exposição prévia ou infecção extramedular, uma vez que há quebra da barreira hematoencefálica em consequência do processo inflamatório (Silva et al., 2004).

#### Diagnóstico da Forma Aguda da Esquistossomose

O diagnóstico da forma aguda toxêmica da esquistossomose mansonii apresenta algumas peculiaridades e muitas vezes constitui um desafio para os médicos, já que pacientes com infecção crônica, provenientes de áreas endêmicas, podem apresentar hepatoesplenomegalia febril concomitante, quadro clínico semelhante ao da esquistossomose aguda. Complementando o exame clínico, a ultrasonografia abdominal tem demonstrado ser útil na definição do quadro, sendo observados aumento inespecífico do fígado e do baço, além da presença de linfadenomegalia peripancreática e periportal (Lambertucci et al., 1994; Rabello et al., 1994).

Até recentemente, o diagnóstico da forma aguda baseava-se em características epidemiológicas e clínicas, presença de ovos do parasito nas fezes e eosinofilia. A biópsia hepática que apresenta principalmente granulomas, na fase necrótico-exsudativa, e degeneração de hepatócitos consiste no diagnóstico definitivo da forma aguda da esquistossomose, mas está, atualmente, raramente indicada, devido às opções não invasivas de diagnóstico.

Kanamura et al. (1979, 1991) observaram na fase aguda, por imunofluorescência indireta, resposta elevada de anticorpos IgA contra antígenos de ovo, em secções de granulomas de fígado de camundongos infectados, e contra antígenos de intestino de vermes adultos, em secções de verme parafinado. Níveis elevados de IgA1 contra antígenos de verme adulto e de ovos de *S. mansoni* foram demonstrados em pequeno número de pacientes recém-infectados (Evengard et al., 1990).

Um marco na caracterização da resposta imune humoral (nesse caso, não se deve aglutinar) na esquistossomose mansoni refere-se à distinção das fases aguda e crônica da doença a partir da detecção de anticorpos séricos IgG e IgM reativos à hemocianina do molusco marinho *Megathura crenulata*, conhecida como *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) e produzida em escala industrial. Mansour et al. (1989) elegeram tal antígeno para estudo, em função da presença de um epítipo comum entre a hemocianina e o esquistossômulo. Tal escolha baseou-se na caracterização de um antígeno de aproximadamente 200 kDa como principal alvo dos anticorpos anticarboidrato na superfície dos esquistossômulos, com resposta exuberante em indivíduos com a fase aguda da esquistossomose e discreta em indivíduos com a fase crônica da doença (Grzych et al., 1987). A pesquisa de anticorpos séricos IgG e IgM anti-KLH através de Elisa possibilitou a distinção entre as fases aguda e crônica da esquistossomose. Alves-Brito et al., em 1992, confirmaram tais achados e demonstraram a baixa resposta IgG ao KLH em indivíduos com esquistossomose mansoni crônica, portadores de outras doenças infecciosas ou não infectados.

Rabello et al. (1995) definiram o diagnóstico imunológico da fase aguda da esquistossomose em um grupo de 18 indivíduos simultaneamente infectados por *S. mansoni*, a partir da detecção de níveis elevados de anticorpos séricos IgG e IgM anti-KLH e anticorpos IgA anti-SEA. Níveis elevados destes anticorpos e de anticorpos IgM anti-SEA correlacionaram-se positivamente com a morbidade da doença, após ajustamento por idade e intensidade do contato com água. O acompanhamento desta população revelou queda significativa dos níveis dos anticorpos IgA anti-SEA e IgM anti-KLH dois meses após o tratamento. Em relação aos anticorpos IgG anti-KLH, foi constatado declínio nos níveis séricos 12 a 24 meses após o tratamento, enquanto os níveis séricos dos anticorpos IgG e IgM anti-SEA mantiveram-se inalterados (Rabello, 1997).

A diferenciação sorológica das fases aguda e crônica da esquistossomose empregando-se Elisa, IgG e IgM anti-KLH foi igualmente demonstrada em relação à infecção por *S. japonicum* (Yuesheng et al., 1994; Liping et al., 1996).

A avidéz dos anticorpos IgA, IgM, IgG e sub-classes de IgG de se ligarem ao antígeno solúvel de ovo foi determinada por Gouveia, Rabello & Katz (2001), que observaram predominância de baixa avidéz de ligação dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA na fase aguda da esquistossomose, enquanto a imunoglobulina IgG1 mostrou a maior correlação com a evolução cronológica da infecção, apresentando 100% de baixa avidéz durante a infecção aguda e alcançando 100% de alta avidéz após seis meses.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### Detectando o DNA do Parasito pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), atualmente uma das técnicas mais destacadas da ciência biomédica, surgiu em meados da década de 1980 (Saiki et al., 1985) como uma revolução no campo da biologia molecular e rapidamente se tornou uma das ferramentas mais utilizadas para o diagnóstico de doenças infecciosas. O método permite a amplificação de seqüências de DNA ou RNA do agente infeccioso, copiando-as em larga escala e de maneira específica. A sua importância se faz sentir principalmente em infecções leves, nas quais um método extremamente sensível é necessário para um diagnóstico acurado.

Na década de 1990, o número de publicações descrevendo métodos diagnósticos para doenças infecciosas utilizando a PCR cresceu vertiginosamente, tendo surgido inúmeros ensaios para a detecção de enfermidades tropicais como a malária (Barker et al., 1992; Snounou et al., 1993) e a leishmaniose (Lopez et al., 1993; Piarroux et al., 1993). Embora alguns ensaios moleculares já tivessem sido desenvolvidos para detecção dos parasitos do gênero *Schistosoma* em águas infestadas e nos hospedeiros intermediários, o uso da PCR para o diagnóstico da esquistossomose só seria descrito uma década depois.

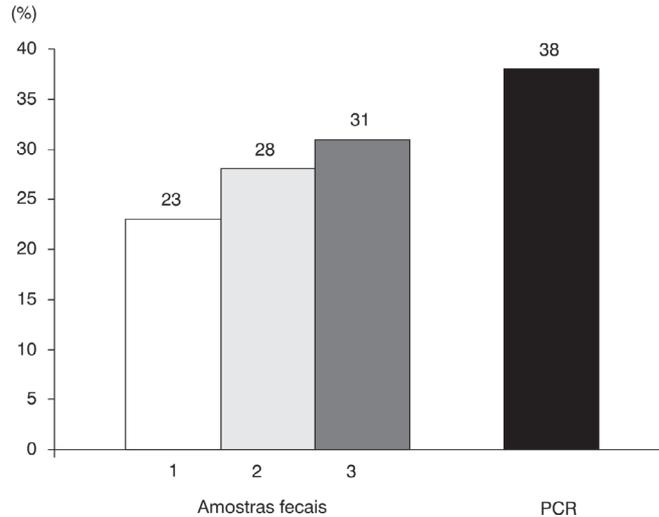
O único ensaio de PCR atualmente disponível para o diagnóstico da esquistossomose mansonii (Pontes, Dias Neto & Rabello, 2002; Pontes et al., 2003) se baseia na amplificação de uma seqüência de DNA altamente repetitiva encontrada no genoma do parasito e descrita por Hamburger et al., em 1991. Esta seqüência é extremamente abundante, correspondendo a cerca de 10% de todo o material genético de *S. mansonii* (seiscentas mil cópias/genoma haplóide), sendo encontrada em ambos os sexos do parasito.

A sensibilidade da técnica para a detecção desta seqüência de *S. mansonii* se mostrou bastante satisfatória, sendo o limite de detecção do DNA isolado de ovos de apenas um fentograma ( $10^{-15}$ g), o que corresponde à fração de 0,002 do parasito. O ensaio foi dez vezes mais sensível que o exame parasitológico de Kato-Katz e na validação do teste em área endêmica foi capaz de detectar 16 casos positivos não detectados pelo exame parasitológico, o que representa 8% a mais no número de pessoas corretamente diagnosticadas. Um único ensaio de PCR revelou prevalência de infecção de 38%, contra 31% estimado por três exames parasitológicos (Gráfico 1). Também na avaliação da eficácia do tratamento (controle de cura) a PCR se mostrou mais precisa. Apesar da diferença no número de casos detectados, o índice estatístico de Kappa entre os dois métodos foi bastante alto (0,8), indicando boa concordância entre eles. Esta é uma situação bastante diferente da normalmente encontrada em comparações entre o exame parasitológico e técnicas baseadas na detecção em que o índice de Kappa pode assumir valores muito baixos (0,088-0,166) (Kanamura et al., 2002). Além de mais sensível, a PCR se mostrou também bastante específica, não amplificando DNA de outros helmintos analisados e apresentando desempenho satisfatório no estudo realizado em área endêmica.

As desvantagens associadas ao uso da PCR para o diagnóstico da esquistossomose são semelhantes às encontradas em relação a outras doenças. Em termos técnicos, os dois principais problemas, que devem ser motivo de cautela e justificam ações específicas, são a possibilidade de inibição da enzima e o risco de contaminação das amostras analisadas. O problema da inibição pode ser abordado pela diluição do DNA extraído, o que também dilui os inibidores, ou pelo uso de controles internos. Os controles são seqüências que devem ser sempre amplificadas na reação, independente da seqüência específica do parasito, que só deve ser detectável nos indivíduos infectados. A ocorrência de contaminação por DNA amplificado pode ser

minimizada pelo uso de ambientes, equipamentos e reagentes exclusivos para a realização de cada uma das principais etapas envolvidas. Assim, recomenda-se um ambiente para extração de DNA, outro para a mistura dos reagentes de amplificação e outro para a amplificação (termociclador), a corrida de gel e a visualização das bandas. Além disso, a ocorrência de contaminação deve ser monitorada pela inclusão de, pelo menos, dois controles negativos (não contendo DNA extraído) por cada reação de amplificação.

Gráfico 1 – Prevalências de infecção por *S. mansoni* estimadas por um, dois ou três exames de fezes pelo método de Kato-Katz e por um exame de PCR



Fonte: Pontes et al. (2003).

## VALIDADE TÉCNICA E APLICABILIDADE

No Quadro 4 são ilustradas as quatro categorias possíveis de classificação de doença por um método diagnóstico e sua relação com a situação verdadeira e suas inter-relações.

Quadro 4 – Quatro categorias possíveis de classificação de doença por um método diagnóstico e sua relação com a situação verdadeira e suas inter-relações\*

		Teste		Sensibilidade: $\frac{a}{a + b}$	Valor Preditivo Positivo: $\frac{a}{a + c}$
		Positivo	Negativo		
Doença	Presente	a	b	Eficiência do teste: $\frac{a + d}{a + b + c + d}$	
	Ausente	c	d		

\* Sensibilidade: capacidade de uma determinada técnica em detectar indivíduos verdadeiramente doentes ( $a / a + b$ ).

Especificidade: capacidade de um teste de apresentar resultados negativos na ausência de doença e de não apresentar resultados falsamente positivos ( $d / c + d$ ).

Valor preditivo positivo: proporção dos resultados com teste positivo, que identificam verdadeiramente a presença da doença, em relação a todos os testes positivos ( $a / a + c$ ).

Valor preditivo negativo: proporção dos resultados com teste negativo, que identificam verdadeiramente a ausência da doença, em relação a todos os testes negativos ( $b / b + d$ ).

Eficácia: capacidade do teste de classificar corretamente o maior número de indivíduos avaliados entre verdadeiramente doentes e saudáveis ( $a + d / a + b + c + d$ ).

As inter-relações descritas no Quadro 4 dependem exclusivamente de características do teste. Os valores preditivos incorporam em sua definição o aspecto prevalência da doença em determinada população.

Mantendo-se as características de sensibilidade e especificidade do teste, a probabilidade de um indivíduo que apresente o teste positivo ser realmente doente (valor preditivo do resultado positivo) depende da especificidade do teste e da prevalência da doença na população à qual o indivíduo pertence. Já a probabilidade de um indivíduo que apresente teste negativo esta verdadeiramente são depende da sensibilidade do teste e da prevalência da doença na população.

O exemplo do Quadro 5 ilustra como os valores preditivos são dependentes da situação onde é realizado determinado teste diagnóstico.

Quadro 5 – Valores preditivos de um teste diagnóstico hipotético

<p>Teste hipotético</p> <p>Sensibilidade: 90%</p> <p>Especificidade: 90%</p>
--

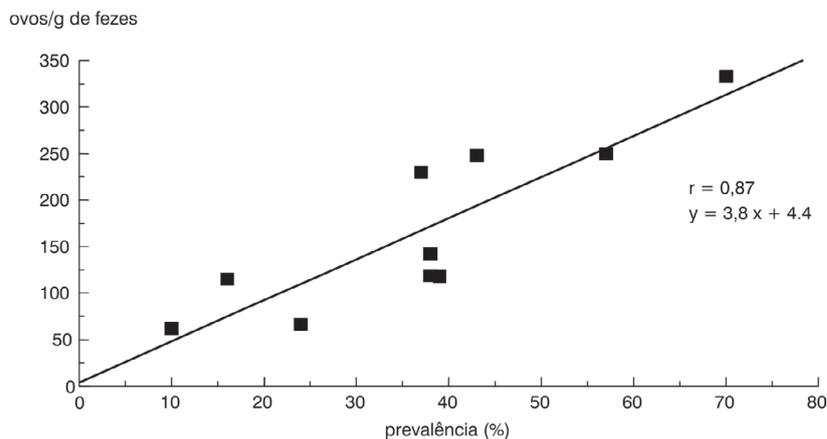
Prevalência: 20%    Prevalência: 50%  
 Valor Preditivo Positivo: 69,2%    Valor Preditivo Positivo: 90,0%  
 Valor Preditivo Negativo: 97,3%    Valor Preditivo Negativo: 90,0%

Diante disso, pode-se dizer que quanto maior a prevalência, maior a probabilidade de um resultado positivo pertencer a um doente e menor a probabilidade de um resultado negativo pertencer realmente a um indivíduo sadio.

O exame de fezes para o diagnóstico de parasitoses como a esquistossomose apresenta dois aspectos especiais que precisam ser considerados quando avaliados sua sensibilidade e seus valores preditivos. Primeiro, a não ser por troca de resultados (erro virtual), a especificidade do teste é 100%. Ao se visualizar o ovo de *S. mansoni* nas fezes, não existe possibilidade de se tratar de um paciente falso-positivo. Segundo, como mencionado anteriormente, a sensibilidade do método aumenta com o aumento da intensidade de infecção.

No Gráfico 2 são apresentadas a relação linear entre prevalência e intensidade de infecção na experiência de dez áreas endêmicas de Minas Gerais, avaliadas pelo Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz.

Gráfico 2 – Regressão linear entre valores de prevalência e média geométrica do número de ovos por grama de fezes em dez áreas endêmicas avaliadas pelo Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz



Assim, para uma área endêmica com prevalência de 20%, espera-se o encontro de média geométrica de setenta ovos por grama de fezes e sensibilidade do exame de uma amostra fecal em torno de 70%. Já para área endêmica de 50%, espera-se média geométrica do número de ovos de duzentos ovos por grama de fezes e sensibilidade de 90%. Vêm-se no Quadro 6 as conseqüências desta variação, em dados hipotéticos.

Quadro 6 – Indicadores epidemiológicos do método de Kato-Katz em duas localidades hipotéticas

Método de Kato-Katz  
Diagnóstico de Esquistossomose

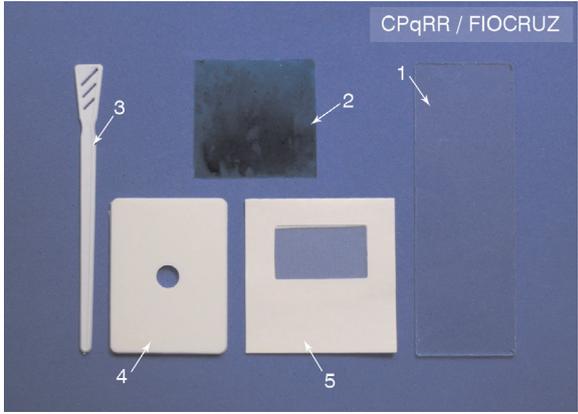
Prevalência: 20% Prevalência: 50%  
Intensidade de Infecção: 70 opg Intensidade de Infecção: 200 opg

Sensibilidade: 80% Sensibilidade: 90%  
Especificidade: 100% Especificidade: 100%

Valor Preditivo Positivo: 100% Valor Preditivo Positivo: 100%  
Valor Preditivo Negativo: 95,2% Valor Preditivo Negativo: 90%

MÉTODO DE KATO-KATZ: PROCEDIMENTO TÉCNICO

**MATERIAL NECESSÁRIO**



Lâmina comum de microscopia (1)  
Lamínula de celofane permeável e pré-colorida (2)  
Espátula (3)  
Placa perfurada (4)  
Tela com malha de nylon (5)

**PROCEDIMENTO**



Retirar uma amostra de fezes com auxílio de espátula e colocar sobre um papel absorvente

PROCEDIMENTO (continuação)

Depositar sobre as fezes a tela, comprimindo-a com o auxílio da espátula, o que fará com que parte das fezes passe através das malhas



Recolher as fezes que passaram pela malha com a espátula e preencher o orifício da placa perfurada, que já deverá estar sobre a lâmina de vidro de microscópio



Passar a parte lateral da espátula sobre o orifício da placa para retirar o excesso de fezes. Desprezar espátula e tela com malha



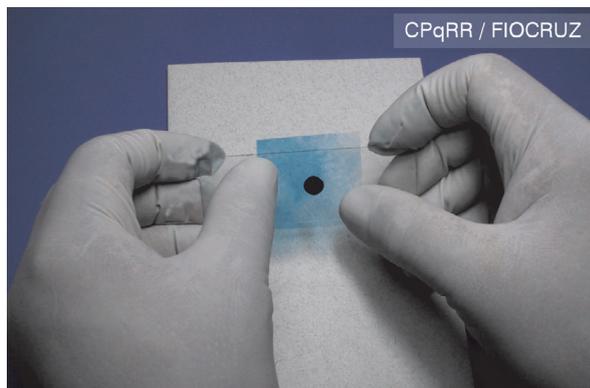
PROCEDIMENTO (continuação)



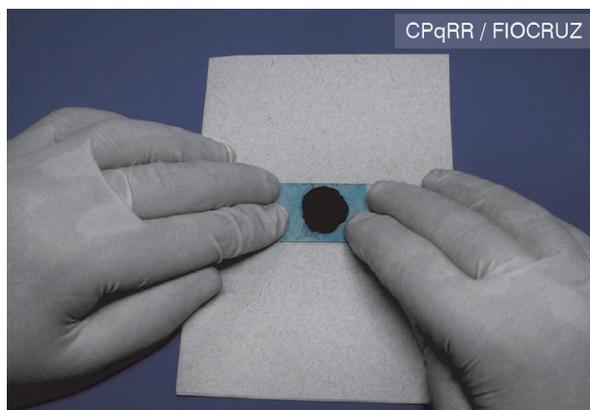
Retirar a placa perfurada de modo a ficar sobre a lâmina de vidro um cilindro de material fecal. Desprezar a placa perfurada



Colocar sobre o cilindro de fezes a lamínula pré-colorida

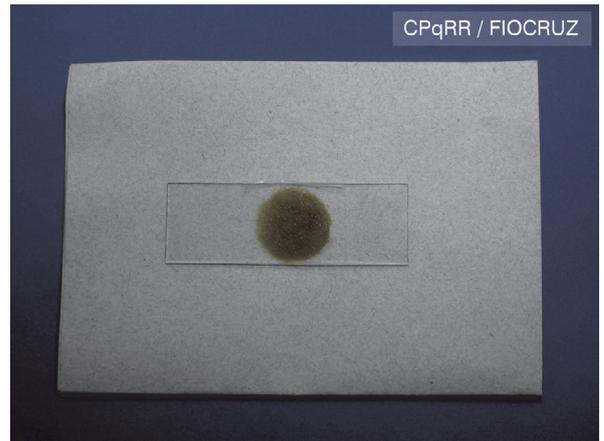


Inverter a preparação sobre a superfície lisa e comprimir o cilindro de fezes, de modo que o material se espalhe uniformemente entre a lâmina e a lamínula. Evitar que as fezes extravasem



## PROCEDIMENTO (continuação)

Deixar a preparação em repouso por sessenta minutos, em temperatura ambiente, e examinar ao microscópio



Nota: assistência técnica de Áureo Almeida de Oliveira na elaboração deste procedimento.

## PERSPECTIVAS

Pelo exposto anteriormente, pode-se perceber a necessidade de estudos comparativos, conduzidos em áreas de diferentes características endêmicas, para melhor definição dos indicadores de eficiência dos métodos diagnósticos disponíveis. Há consenso na literatura de que os métodos parasitológicos são adequados e suficientes para diagnóstico da esquistossomose mansonii em áreas de elevadas prevalência e intensidade de infecção. Estes instrumentos já mostraram sua utilidade operacional em dezenas de países. Mesmo tendo sido descrito há mais de trinta anos, o método de Kato-Katz continua imprescindível.

Os métodos de detecção de anticorpos específicos deixam a desejar em especificidade e carecem de padronização. A primeira e necessária tentativa de se padronizar e avaliar os vários ensaios imunodiagnósticos baseados na determinação de anticorpos séricos está em um estudo clássico de Mott & Dixon, de 1982. Em estudo multicêntrico, os autores avaliaram 17 preparações antigênicas. Os testes de hemoaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, Elisa, reação periovular, radioimunoensaios, índio-imunoensaios e microdifusão dupla foram realizados com diferentes antígenos. Os resultados não indicaram superioridade de nenhum dos métodos.

Os confrontos dos dados de prevalência de uma região endêmica obtidos por exame de fezes e determinação de anticorpos geralmente resultam em maior positividade nos resultados do exame sorológico (Polderman, 1975; Hoshino-Shimizu et al., 1986). Existem duas possibilidades de categorias: excesso de falso-positivos por avaliação sorológica ou excesso de falso-negativos por interpretação parasitológica. A inespecificidade da presença de anticorpos contra *S. mansoni* na ausência de infecção ativa se explica por reatividade cruzada com outros parasitos (Corrêa-Oliveira et al., 1988), infecções unissexuais, contatos com outras cercárias, transferência de anticorpos maternos, tratamento prévio ignorado e persistência de anticorpos após a cura. A busca da técnica ideal deverá ultrapassar os estágios de laboratório e os critérios mínimos de validação, indo à demonstração de sua aplicabilidade no campo e de sua superioridade quando comparada ao exame parasitológico de fezes.

As desvantagens do método de pesquisa de antígenos circulantes são a baixa sensibilidade em infecções leves, o custo elevado, operacionalidade difícil e a dependência da produção de anticorpos monoclonais. A técnica, ainda não eficaz para ser utilizada em programas de controle, tem recebido investimentos

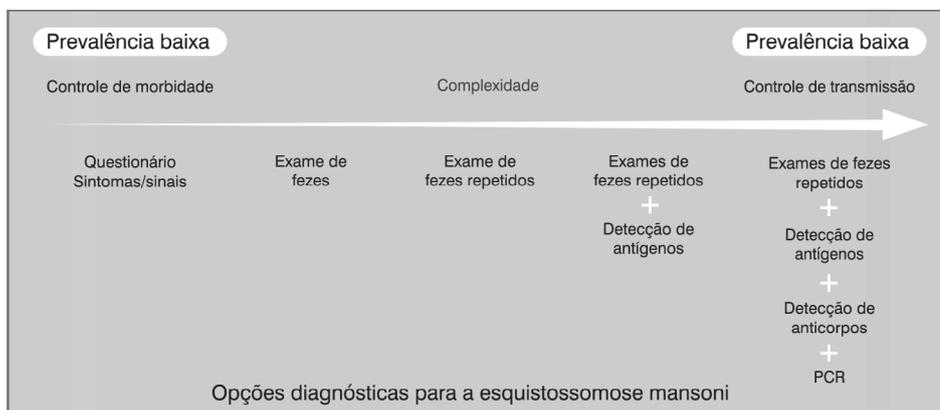
como técnica de escolha para futura avaliação de ensaios de proteção. Consiste também em um bom método para estudos como avaliação da relação antígenemia e morbidade.

Outro aspecto extremamente importante a ser discutido diz respeito à aplicabilidade da PCR para o diagnóstico da esquistossomose. Qual a real utilidade de um ensaio de PCR para o diagnóstico da esquistossomose, uma doença intimamente relacionada a condições socioeconômicas precárias e para qual existe um diagnóstico tão simples, barato e eficiente quanto o Kato-Katz?

É impossível saber, de antemão e com certeza, se a PCR encontrará espaço em meio aos métodos de diagnóstico existentes para a esquistossomose. O que se avizinha como claro é que a sofisticação e as grandes exigências infra-estruturais da tecnologia de PCR provavelmente limitarão a sua utilização a algumas situações específicas. Certamente, à medida que o progresso tecnológico caminha, tais limites serão progressivamente diminuídos. Mas o que se pode afirmar hoje é que a PCR, embora muito útil em algumas situações, não é o método diagnóstico de escolha para a maioria das doenças infecciosas. Também não o será, até onde se pode enxergar com clareza, para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, em grande parte das situações nas quais um exame faz-se necessário.

Para o controle da esquistossomose em áreas endêmicas e grupos populacionais, a prevalência da infecção, o tamanho populacional, a disponibilidade de infra-estrutura e de recursos humanos e financeiros pesam tanto na escolha do método como suas características intrínsecas (sensibilidade, especificidade etc.). Mais ainda, as técnicas têm sido empregadas em vista da situação epidemiológica e dos objetivos do programa. Assim, métodos simples, como questionários de identificação de sintomas e sinais e o exame de fezes em amostra única podem se mostrar suficientes para o controle da morbidade em área de elevada prevalência. Esta é ainda a situação encontrada na África subsaariana. No outro extremo estão países como Marrocos, Arábia Saudita, Venezuela e regiões do Brasil e China, que atingiram prevalências baixas e estáveis, com controle da morbidade, e buscam a interrupção da transmissão. Nestes países a utilização de um exame mais sensível, como a PCR, poderá representar um meio eficaz de diagnosticar indivíduos com cargas parasitárias abaixo do limite de detecção de outros métodos, indivíduos que acabam se tornando responsáveis pela manutenção da transmissão. O esquema da Figura 2 representa situações hipotéticas nas quais o aumento da exigência e da complexidade das opções diagnósticas pode ocorrer, em decorrência do objetivo do programa, das condições de infra-estrutura e recursos financeiros e da realidade epidemiológica de determinada área endêmica.

Figura 2 – Opções diagnósticas para a esquistossomose mansoni



## REFERÊNCIAS

- ALARCON DE NOYA, B. et al. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. *Experimental Parasitology*, 95: 106-112, 2000.
- ALVES-BRITO, C. F. et al. Analysis of anti-keyhole limpet hemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 53-56, 1992.
- ASHTON, P. D. et al. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology*, 122: 329-338, 2001.
- BARBOSA, F. S. *Morbidade da Esquistossomose. Estudo em Quatro Localidades no Estado de Pernambuco*, 1965. Tese de Doutorado, Recife: Faculdade de Medicina, Universidade do Recife.
- BARKER JR., R. H. et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46: 416-426, 1992.
- BARRETO, M. L.; SMITH, D. H. & SLEIGH, A. C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 554-555, 1990.
- BELL, D. R. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces with special reference therapeutical trials. *Bulletin of the World Health Organization*, 29: 525-530, 1963.
- BERGQUIST, N. R. Present aspects of immunodiagnosis of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 29-38, 1992.
- BLAGG, W. Et al. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4: 23-28, 1955.
- BORDET, J. & GENGOU, O. Sur la existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiques. *Annales de l'Institut Pasteur*, 15: 289-302, 1901.
- BOU, D.; SANTORO, F. & CAPRON, A. Détection des immunocomplexes dans la bilharziose. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 5: 631-636, 1975.
- BUCK, A. A. et al. Comparative studies of some immunologic screening tests for schistosomiasis in Ethiopia. *American Journal of Hygiene*, 80: 75-84, 1964.
- CANÇADO, J. R. et al. Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infection by the quantitative oogram technique. *Bulletin of the World Health Organization*, 33: 557-566, 1965.
- CESARI, I. M. et al. Specificity of the solid phase alkaline phosphatase immunocapture assay for the diagnosis of human *Schistosoma mansoni* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92: 38-39, 1998.
- COELHO, P. M. Z. & TAVARES, C. A. P. Diagnóstico imunológico. In: CASTRO, L. P.; ROCHA, P. R. S. & CUNHA, A. S. (Eds.) *Tópicos em Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: Medsi, 1991. v. 2
- COELHO, R. A. L. et al. Magnetic polysiloxane-polyvinil alcohol composite as solid phase in chemiluminescent assays. *Biotechnology Letters*, 24: 1.705-1.708, 2002.

- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Human antibody response against schistosomal antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38: 348-355, 1988.
- DE JONGE, N. et al. Detection of circulating anodic antigen by Elisa for seroepidemiology of schistosomiasis mansoni. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 591-594, 1988.
- DE JONGE, N. et al. Presence of the schistosome circulating anodic antigen (CAA) in urine of patients with *Schistosoma mansoni* or *S. haematobium* infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41: 563-569, 1989.
- DE VLAS, S. J. et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. *Parasitology*, 114: 113-121, 1997.
- DISCH, Y. et al. Day to day fluctuation of Cca levels in urine of *Schistosoma mansoni* infected children in Brasil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 222-225, 1997.
- DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L. & HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends in Parasitology*, 20(1): 35-39, 2004.
- DUNNE, W. D. et al. The stage-, strain- and species-specificity of a *Schistosoma mansoni* eggs antigen fraction (CEF6) with serodiagnostic potencial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 460-470, 1984.
- ENGELS, D. et al. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57: 571-577, 1997.
- ENGVALL, E.; JONSSON, K. & PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 251: 424-434, 1971.
- EVENGARD, B. et al. Early antibody responses in human schistosomiasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 80: 69-76, 1990.
- FAIRLEY, N. H. The discovery of a specific complement fixation test for bilharziasis and its ratical application to clinical medicine. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 32: 449-460, 1919.
- FAUST, E. C.; INGALLS, J. W. & SEE, J. K. The diagnosis of schistosomiasis japonicum II. Technics for the recovery of the eggs of *Schistosoma japonicum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26: 559-584, 1946.
- FAUST, E. C. et al. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. *The Journal of Parasitology*, 26: 241-262, 1939.
- FUJINAMI, A. & NAKAMURA, H. Experimental studies on the serological eactions in calves experimentally infected with *Schistosoma japonicum*. *Journal of the Kyoto Medical Association*, 6: 224-252, 1909.
- GOUVEIA, L.; RABELLO, A. & KATZ, N. Antibody subclass profile andavdity during acute and chronic human *Schistosoma mansoni* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 550-556, 2001.
- GRZYCH, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *The Journal of Experimental Medicine*, 165: 865-878, 1987.

- HAGAN, P. & ABATH, F. G. C. Recent advances in immunity to human schistosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 95-98, 1992.
- HAMBURGER, J. et al. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44: 73-80, 1991.
- HASSAN, M. M. et al. Sensitive and specific assay for detecting circulating antigens in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 29: 49-57, 1999.
- HAYAMI, T. & TANAKA, M. Über die Serumreaktion bei den an der japanischen Schistosomum-Krankheit leidenden Tieren. *Kyoto Igaku Zasshi*, 7: 232-238, 1910.
- HILLYER, G. V. & RIVERA-MARRERO, C. Circumoval precipitin antigens for the diagnosis of schistosomiasis. II. Isolation of functional antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31: 785-789, 1982.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A. & JANER, J. L. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical*, 9: 283-298, 1934.
- HOSHINO-SHIMIZU, S. et al. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da esquistossomose mansônica. *Suplemento dos Anais da Academia Mineira de Medicina*, 14: 67-89, 1986.
- JASSIM, A.; CATTY, D. & HASSAN, K. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni in Sudan. *Parasite Immunology*, 9: 651-665, 1987.
- KAGAN, I. G. Hemagglutination after immunization with schistosome antigens. *Science*, 122: 376-377, 1955.
- KANAMURA, H. Y. et al. Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic schistosomiasis mansoni. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28(2): 242-248, 1979.
- KANAMURA, H. Y. et al. Anticorpos séricos IgA no diagnóstico da fase aguda da esquistossomose mansônica. *Instituto Adolfo Lutz*, 52: 101-104, 1991.
- KANAMURA, H. Y. et al. IgM-immunofluorescence test as a diagnostic tool for epidemiologic studies of schistosomiasis in low endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 485-489, 2002.
- KATO, K. A correct application of the thick-smear technique with cellophane-paper cover. *A pamphlet* 1-9 (Japanese text), 1960.
- KATO, K. & MIURA, M. Comparative examinations. *Japanese Journal of Parasitology*, 3: 35, 1954. (Japanese text).
- KATZ, N.; CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14: 397-340, 1972.
- KNIGHT, W. B. et al. A modification of the formol ether concentration technique for increased sensitivity in detection of *Schistosoma mansoni* eggs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25: 818-823, 1976.
- KOMIYA, Y. & KOBAYASHI, A. Evaluation of Kato's thick-smear technic with cellophane cover for helminth eggs in feces. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 19: 59-68, 1966.
- LAMBERTUCCI, J. R. et al. Acute schistosomiasis mansoni: sonographic features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 76-77, 1994.

- LI, Y. L. et al. Detection of *Schistosoma japonicum* antigen (Sj31/32) in sera of Chinese patients using a sandwich Elisa based on monoclonal antibody. *Tropical Medicine and Parasitology*, 45: 115-118, 1994.
- LIPING, C. et al. The serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis japonica using IgA antibody to egg antigen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 751-754, 1996.
- LIU, C. & BANG, F. B. Agglutination of cercariae of *Schistosoma mansoni* by immune sera. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 76: 68-72, 1950.
- LOOSS, A. What is '*Schistosomun mansoni*'? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2: 153-192, 1909.
- LOPEZ, M. et al. Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 348-356, 1993.
- LUNDE, M. N. & OTTENSEN, E. A. Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 82-85, 1980.
- LUTZ, A. *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis observed in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 11: 109-140, 1919.
- MANSON, P. Report of a case of bilharzia from the West Indies. *BMJ*, 2: 1.894-1.895, 1902.
- MANSOUR, M. M. et al. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet hemocyanin. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4: 338-344, 1989.
- MARTIN, L. K. & BEAVER, P. C. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 17: 382-391, 1968.
- MARTINS, A. V. Sobre a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método da sedimentação-concentração. *Brazil-Médico*, 51: 319-321, 1937.
- MARTINS, A. V. *Diagnóstico de Laboratório da Esquistossomose Mansônica*, 1949. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MILLER, R. L. et al. Palaeoepidemiology of schistosoma infection in mummies. *BMJ*, 304: 555-556, 1992.
- MINNING, W. Immunbiologische Nachweismethoden bei Bilharziosen. *Deutsche Tropenmedizinische Zeitschrift*, 45: 321-323, 1941.
- MONTENEGRO, S. M. L. Immunodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 333-335, 1992.
- MONTENEGRO, S. M. L. et al. Dot- enzyme linked immunosorbent assay (dot-Elisa) for schistosomiasis diagnosis using dacron as solid phase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 139-143, 1999.
- MOTT, D. E. & DIXON, H. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 60: 729-753, 1982.
- NOYA, O. et al. Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low transmission: a review of a line of research. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 167-169, 2002.
- OKABE, K. & TANAKA, T. A new precipitin reaction for schistosomiasis japonica. *The Kurume Medical Journal*, 5: 45-52, 1958.

- OLIVER-GONZALEZ, J. Anti-egg precipitin in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Infectious Diseases*, 95: 86-91, 1954.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *O controle da esquistossomose*. Genebra: OMS, 1994. (Relatório Técnico, 830)
- OTTALINA, C. & ATENCIO, H. M. Nuevos caminos para o diagnóstico clinico preciso de la schistosomiasis mansoni. *Revista de la Policlínica Caracas*, 12: 1-35, 1943.
- PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R. & HOCKMEYER, W. T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-Elisa): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Immunological Methods*, 64: 205-214, 1983.
- PIARROUX, R. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 364-369, 1993.
- POLDERMAN, A. M. The transmission of intestinal schistosomiasis in Begemder Province, Ethiopia. *Acta Leiden*, 42: 1-193, 1975.
- POLMAN, K. et al. 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: 150-154, 1998.
- POLMAN, K. et al. Evaluation of density-dependent fecundity in human *Schistosoma mansoni* infections by relating egg counts to circulating antigens through Deming regression. *Parasitology*, 122: 161-167, 2001.
- PONTES, L. A.; DIAS NETO, E. & RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 157-162, 2002.
- PONTES, L. A. et al. Comparison of a PCR assay and the Kato-Katz technique for diagnosing *Schistosoma mansoni* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 652-656, 2003.
- RABELLO, A. *O Exame de Fezes, a Biópsia Retal e o Teste Imunoenzimático no Diagnóstico da Esquistossomose Mansônica Humana*, 1990. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
- RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 (5): 669-676, 1997.
- RABELLO, A. et al. Dot-Dye-Immunoassay for the diagnosis of schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 187-190, 1992.
- RABELLO, A. L. T. et al. Abdominal ultrasonography in acute clinical schistosomiasis mansoni. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 748-752, 1994.
- RABELLO, A. L. T. et al. Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity. *Clinical Infectious Diseases*, 21: 608-615, 1995.
- REY, L. Parasitos e doenças parasitárias nas Américas e na África. In: REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RIPERT, C. et al. Detection with a monoclonal antibody of an antigen, characteristic of the genus *Schistosoma*, excreted in the urine. *Tropical Medicine and Parasitology*, 39: 131-135, 1988.

- RUFFER, M. A. Note on the presence of *Bilharzia hematobium* in Egyptians mummies of the twentieth dynasty (1200-1000 BC). *BMJ*, 2: 16, 1910.
- SADUN, E. H.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. Fluorescent antibody technic for sero-diagnosis of schistosomiasis in humans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 105: 289-291, 1960.
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1.350-1.354, 1985.
- SAMBOM, L. W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10: 303-304, 1907.
- SAPERO, J. J. & LAWLESS, D. K. The 'M.I.F.' stain-preservation technic for identification of intestinal protozoa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2: 613-619, 1953.
- SCHRAMM, G. et al. Molecular characterization of an Interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 18.384-18.392, 2003.
- SENERFIT, L. B. Immobilization of *Schistosoma mansoni* miracidia by immune sera. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84: 5-7, 1953.
- SILVA, L. C. S. et al. Mielorradiculopatia esquistossomática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(3): 261-272, 2004.
- SILVA, P. Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia. *Brazil-Médico*, 22: 281-283, 1908.
- SILVA, Y. P. et al. Circulating antigens levels in different clinical forms of the *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 83-86, 1999.
- SMITHERS, S. R. & DOENHOFF, M. J. Schistosomiasis. In: COHEN, S. & WARREN, K. S. *Immunology of Parasitic Infections*. Londres: Year Book Medical Pub., 1982.
- SNOUNOU, G. et al. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 649-653, 1993.
- SNOWDEN, K. & HOMMEL, M. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. *Journal of Immunological Methods*, 140: 57-65, 1991.
- STEK, M. et al. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay using crude *S. haematobium* soluble egg antigen with a radioimmunoassay using purified *S. mansoni* egg antigen for the serodiagnosis of schistosomiasis haematobium. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 1-6, 1985.
- SUEYASU, Y. Über die Komplementbindungs-Reaktion bei mit Schistosomum japonicum kunstlich infizieren Pferden. *Kyoto Igaku Zasshi*, 33: 466-468, 1916.
- VAN LIESHOUT, L. et al. Assessment of cure in schistosomiasis patients after chemotherapy with praziquantel by quantitation of circulating anodic antigen (CAA) in urine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 323-328, 1991.
- VAN WEEMEN, B. K. & SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Febs Letters*, 15: 232-236, 1971.

- VOGEL, H. & MINNING, W. Hüllenbildung bei Bilharzia- Cercarien in serum bilharzia- infizierter Tiere und Menschen. *Zentralbl fBakt*, 153: 91-105, 1949.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A. & BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 98-106, 1976.
- WASSERMAN, A.; NEISSER, A. & BRUCK, C. Eine diagnostische reaktion bei syphilis. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 32: 745-746, 1906.
- WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *The Medical Journal of Australia*, 6: 375-376, 1921.
- WU, G. A historical perspective on the immunodiagnosis of schistosomiasis in China. *Acta Tropica*, 82: 193-198, 2002.
- YOSHIMOTO, M. Ueber die Komplementbindungsreaktion bei der Schistosomum-Krankheit in Japan. *Zeitschrift Immunitätsforschung*, 4: 438-445, 1910.
- YUESHENG, L. et al. The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection by Elisa using keyhole limpet hemocyanin as antigen. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 249-251, 1994.