

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

VIVIAN FAVERO

APRIMORAMENTO DO MÉTODO HELMINTEX[®] PARA DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* BASEADO NA DETECÇÃO DE OVOS

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 MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

VIVIAN FAVERO

APRIMORAMENTO DO MÉTODO HELMINTEX[®] PARA DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* BASEADO NA DETECÇÃO DE OVOS

Orientadora: Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Co-Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção de grau de Doutorado pelo
Programa de Pós-graduação em Medicina e
Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

PORTO ALEGRE

Fevereiro de 2019

Ficha Catalográfica

F273a Favero, Vivian

Aprimoramento do método Helmintex® para diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni* baseado na detecção de ovos / Vivian Favero . – 2019.

216.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira.

1. Esquistossomose. 2. Baixa endemicidade. 3. Sensibilidade. I. Carlini, Célia Regina Ribeiro da Silva. II. Graeff-Teixeira, Carlos. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

**À minha mãe Dolores (*in memorian*), com
toda saudade do mundo!**

Sabe, carinho de mãe é sempre aveludado,
por mais ásperas que sejam as suas mãos. O
cheiro dela é sempre gostoso, mesmo que ela
não use perfume... é cheiro de amor, o
verdadeiro amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos que me deram a vida, e que estiveram ao meu lado nos primeiros passos, primeiras palavras, primeiros tombos e fizeram de mim um pedacinho de cada um deles...

Mãe (Dolores), meu grande exemplo de luta, de coragem, de dedicação, de carinho, de honra, minha professora nas artes culinárias, a razão por não ter desistido de meus sonhos, a leonina responsável por ter me tornado a mulher forte/guerreira/linha dura que sou hoje. Amo-te por toda eternidade minha linda e tão amada estrelinha!

Pai (Pedro), meu exemplo de generosidade, de trabalho duro, de nunca baixar a cabeça, de acreditar que um dia tudo vai dar certo, a razão por eu estar aqui hoje firme e forte, o meu banco particular ao qual já devo vidas, o homem duro nas palavras, mas de coração mole. Amo-te meu Pedrinho!

Aos que carregam meu sangue italiano + polonês, que fizeram parte de minha criação e que moldaram um pouco do meu jeito de ser, pensar e agir: meus avôs e avós (Sivila e Albina) minhas lindas estrelinhas; meus tios e tias em especial, Carmen (Tia Carme) e Teresinha (Tia Têre), que sempre oram por mim e se preocupam demasiadamente comigo; meus primos; meu sobrinho Pietro lindão e meu irmão Camilo, o maluco que me faz ter altos níveis de tolerância, mas que amo de todo coração.

Ao meu namorado Eduardo Premaor (Edu), que não tinha noção da complicação e intensidade que seria encarar viver ao meu lado. Nestes cinco anos enfrentou médicos, inúmeros exames, tratamentos complicados e muitos medos, mas acima de tudo tenta a cada dia encarar o meu melhor e tornar este a base da nossa escolha. Amo-te!

Aos meus velhos amigos de infância e amigos que a vida me deu de presente, aqueles que estiveram comigo na saúde e nos dias mais sombrios de minha doença, dedicando um pouco de seu tempo. Em especial a Diana e Silvio, Lira e Marcos, meus compadres, vocês são elementos importantíssimos na minha caminhada e no meu crescimento pessoal, por isto vocês fazem parte desta conquista!

Aos meus médicos, que sempre levantaram meu humor, trataram meu medo e desespero com toda paciência e dedicação. Dr. Alberto Molinari e Dr^a. Elisa Munoz Santos devo esta vitória a dedicação de vocês!

A minha segunda família, à família parasito, aquela que me proporcionou crescimento profissional e pessoal. Foram tantos momentos e muitos membros que fizeram parte desta aventura nestes oito anos, muitos deixaram saudades e outras incontáveis lembranças.

Prof. Carlos Graeff-Teixeira, não tenho palavras para agradecer a confiança e aposta que fizestes em mim. Tivestes a capacidade de me ajudar a ser mais forte, de acreditar no impossível, e torna-lo real. Agradeço a oportunidade de crescimento pessoal e profissional, agradeço a possibilidade de me apresentar uma realidade diferente da que eu estava acostumada, agradeço pelos dias duros de trabalho de campo e as inúmeras gargalhadas que mesmo em meio ao cansaço tornam estes momentos tão lindos.

Prof^a. Alessandra L. Morassutti (Ali), obrigada por estar sempre disposta a ajudar, orientar e acima de tudo direcionar. Grata pelas inúmeras correções, pelos dias que sentastes comigo e tentastes fazer esta teimosa direcionar seu pensamento por inúmeras vezes diléxico e pelas incontáveis vezes que me aclamastes em meio as minhas tempestades mentais.

Rê Russo (Renata R. F. Candido) agradeço por ter me recebido, acolhido e orientado, fostes à guia de meus primeiros passos. Agradeço pelos imensos papos e inúmeras correções. Deixastes um pouco de ti em mim.

As minhas amadas “parasitoletes”, o que seria de mim sem a ternura da Jow/JowJow/Josislenen (Joana Borges), a doçura da Bi/Bibiene (Bianca B. Cognato), o pulso forte lá de Vacaria da Catiuelem (Catieli G. Lindholz), a grande mãe TOC/hiperativa que habita a Negrinha (Vanessa F. Pascoal) e a alma direta e reta, porém aventureira da Carolaine/Caroline (Carolina D. M. Verissimo)?

Cada um de vocês moldou um pouco de mim, assim posso dizer que hoje sou levemente fofa e doce (bem de leve), adoro estar envolvida em discussões, por vezes grande mãe diz que pareço um “gurizinho”, desenvolvi um nível moderado de TOC e

aprendi que ser direta sem rodeios nos torna verdadeiros. Não tenho como não amar cada uma de vocês!

As minhas ICs prediletas Renata Perotto e Francine Rigo, vocês me enlouquecem, por inúmeras vezes me tiram do rumo, mas não tem como não me encher de orgulho de vocês e ter a certeza de que estão no caminho certo.

Prof^a. Célia R. R. S. Carlini sou grata por ter aceitado esta batalha, por ter tentado me compreender e entender meu modo de ser. Obrigado por me defender, por me apresentar uma nova visão de trabalho, por me corrigir, por inúmeras vezes acalmar minha mente e ansiedade direcionando minhas apresentações e experimentos.

Angela R. Piovesan, a doce e meiga Angela, agradeço por me ajudar nesta caminhada, me escutar tantas vezes e ter paciência com os mil e um experimentos. Paper luminol não existira sem tua dedicação e paciência comigo.

Agradeço em especial à:

Prof. Vinicius Duval da Silva, pela dedicação que tivestes comigo desde o primeiro dia, por ter se me direcionado da melhor forma que poderias fazer e por ter aguentado meus surtos de ansiedade com quase tudo que envolvia meu trabalho.

Prof. Stefan M. Geiger, pela dedicação em campo, pelos ensinamentos, pela confiança e ajudar sempre que solicitado;

Vanessa Normandio pela parceria em campo, por ter aberto sua casa, por ter me apresentado BH, por me ensinar mineirês, por tantas risadas, por ter sido sempre doce, amiga e parceira;

A todos os parceiros de campo em Januária/MG, saudades enormes;

Prof^a. Fernanda Chiarello Stedile, por ter me recebido tão bem e auxiliado;

Prof. Malclom K. Jones por acreditar tanto nesta menina e por ser um grande incentivador de meu trabalho;

Breda por tantas vezes ter ajudado, buscado ou testado alternativas viáveis para meus experimentos, e principalmente agradeço por tem me colocado em contato com Angela e Prof^a. Célia, antes mesmo de fazer parte do grupo;

Prof^a. Maria Martha Campos por ter me concedido auxílio com equipamentos do Centro de Pesquisas de Toxicologia e Farmacologia (INTOX), e a Rafaela e Gabriel por ter me auxiliado;

Dr. Claudio Cerqueira Lopes e aos colaboradores do LASAPE pela atenção e por aceitarem o desafio de testar o luminol brasileiro em ovos de *S. mansoni*;

Dr. Fabio L. M. Maito e a Técnica Janaína Pasetti Nunes por aceitarem os desafios que complementam o Capítulo III desta Tese;

A todos que me ajudaram, incentivaram e apoiaram durante os últimos quatro anos.

Gratidão por serem instrumentos de minha evolução pessoal e profissional!

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A esquistossomose humana é apontada como uma das doenças tropicais mais devastadoras, afetando cerca de 250 milhões de indivíduos em todo o mundo. Por este motivo, é considerada a segunda doença parasitária mais importante em termos de efeito socioeconômico, perdendo apenas para malária. No Brasil, o *Schistosoma mansoni* é o único agente etiológico da esquistossomose e atinge 19 Estados. Em áreas de recente introdução da doença ou onde ocorre o controle, a baixa carga parasitária é uma realidade, e sua detecção é dificultada pela baixa sensibilidade diagnóstica dos métodos disponíveis. O Helmintex[®] é um método proposto recentemente, que utiliza uma grande quantidade de fezes, inúmeros processos de concentração, e adição de partículas paramagnéticas, provando-se com alta sensibilidade para a detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes. No entanto, é um processo laborioso, com limitada aplicação em campo e demora na entrega do diagnóstico. O foco principal desta Tese é o aprimoramento de metodologias de detecção de ovos para o diagnóstico da esquistossomose, buscando, principalmente, o melhoramento da metodologia Helmintex[®]. Desta forma, o primeiro capítulo desta Tese propõe a redução do sedimento final Helmintex[®], com o uso de detergente neutro, Tween 20, e a coloração dos ovos de *S. mansoni* com ninidrina, buscando otimizar a metodologia. O segundo capítulo visa o uso de uma reação quimioluminescente para a detecção de ovos *S. mansoni* em meio ao sedimento final Helmintex[®], objetivando a rapidez no diagnóstico final. Por fim, o terceiro capítulo, explora o entendimento das peculiaridades dos ovos na sua passagem pela parede intestinal, observando a passagem em “cluster” e secreção, pelos ovos, de uma proteína denominada Sm 16. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam o papel proposto ao método Helmintex, de servir como referência para o diagnóstico da esquistossomose intestinal, e para a avaliação comparativa de outros testes, além de registrar pela primeira vez, a formação de “cluster” e a excreção da proteína Sm16 por ovos de *S. mansoni* durante sua migração pela parede intestinal de camundongos.

Palavras Chave: Esquistossomose, baixa endemicidade, sensibilidade.

ABSTRACT

Human schistosomiasis is considered one of the most devastating tropical diseases, affecting about 250 million people around the world. For this reason, it is considered the second most important parasitic diseases in terms of socio-economic effects, losing only to malaria. In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only etiological agent of schistosomiasis, affecting 19 States. In areas of recent disease introduction or where the control occurs, low parasite burden is a reality and its detection is hampered by the low sensitivity of the available diagnostic methods. Helmintex[®] is a recently proposed method that uses a large amount of feces, numerous concentration steps, and addition of paramagnetic particles, conveying high sensitivity for the detection of eggs of *S. mansoni* in feces. However, it is a laborious process, with limited application in the field and delayed delivery of the diagnosis. The objective of this thesis is the improvement of egg detection methodologies for the diagnosis of schistosomiasis, mainly seeking the improvement of the Helmintex[®] methodology. Thus, the first chapter of this thesis proposes the reduction of the final Helmintex[®] sediment, with the use of neutral detergent, Tween 20, and the staining of *S. mansoni* eggs with ninhydrin, aiming to optimize the methodology. The second chapter investigates the use of a chemiluminescent reaction for the detection of *S. mansoni* eggs in the final Helmintex[®] sediment, aiming to speed up the final diagnosis. Finally, the third chapter explores the peculiarities of eggs and their passage through the intestinal wall, observing their clustering and the secretion by the eggs of a protein called Sm 16. The results obtained in this work reinforce the proposed role of the Helmintex method, to serve as a reference for the diagnosis of intestinal schistosomiasis, and for the comparative evaluation of other tests, in addition to registering for the first time, the formation of cluster and the excretion of the protein Sm16 by *S. mansoni* eggs during their migration through the intestinal wall of mice.

Keywords: Schistosomiasis, low endemicity, sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo biológico do *S. mansoni* (Adaptado pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2018).28
- Figura 2:** Imagem de ovos de *S. mansoni* em microscopia em sedimento Helmintex[®]. Microscopia óptica de 20 x. Imagem obtida pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2012.29
- Figura 3:** Ovo de *S. mansoni* visualizado em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A: Imagem do ovo inteiro. B: Superfície do ovo com uma aparência granulada devido à presença de irregularidades e microfilamentos. Imagem obtida pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2016.30
- Figura 4:** Ilustração de lamínula (20 x 26 mm²) contendo amostras de ovos de *S. mansoni* depositados sobre fita de carbono dupla face. 1- F-ovos; 2- FH-ovos; 3- FH-ovos-PMP.99
- Figura 5:** Padronização de garrafa para eclosão e coleta de miracídios. Representação gráfica da garrafa pet padroniza pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS para coleta de miracídios.103
- Figura 6:** Análise da composição química da superfície do ovo de *S. mansoni* por EDS. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um ovo obtido de fezes humanas (FH - ovos) de *S. mansoni* com 25 pontos marcados para análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).104
- Figura 7:** Dados gerados por EDS obtidos de ovos de *S. mansoni*. Médias da análise qualitativa de 25 pontos em triplicatas de ovos. Resultados para os elementos Ni, Zn, Fe, Cu e Mn nas amostras: 1- Iv-ovos; 2 - F-ovos; 3 - FH-ovos.105
- Figura 8:** Gráfico gerado pela análise de RBS, demonstrando retroespalhamento dos átomos de ferro (Fe) perto do canal 1525 em amostra contendo ovos obtidos de fígado de camundongo (F - ovos). O pico indica pequena quantidade de ferro.106
- Figura 9:** Gráficos gerados pela análise de RBS demonstram retroespalhamento dos átomos de ferro (Fe) perto do canal 1525: A- FH-ovos-PMP com pico indicando grande quantidade de ferro, devido à presença de partículas paramagnéticas na superfície dos ovos; B- FH-ovos com pico indicando ferro.107

Figura 10: Pico obtido em Varredura de absorvância (UV) indica presença de proteínas. Varredura de absorvância corresponde a um comprimento de onda de 200 nm a 400 nm das amostras contendo fragmentos de cascas de ovos de <i>S. mansoni</i> (FC), porção solúvel (PS) e miracídios.....	108
Figura 11: Comparação de quimiluminescência (CL) entre porção solúvel (PS), fragmentos de cascas (FC), e miracídios. A- Amostras apresentando curvas de quimiluminescência diferenciadas mantidas ao longo de 5 minutos. B- Gráfico demonstrando área sob a curva das soluções. Porção contendo miracídios (0,25Un/ μ L) apresentou maior quimiluminescência. Todas as amostras apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle PBS 1X ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.	109
Figura 12: Efeito do agente redutor Ditioneitol (DTT), na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. O redutor nas diluições de 20 mM e 50 mM foi pré-incubado com as amostras por 2 horas a temperatura ambiente, antes da adição de luminol. Quando as amostras foram comparadas com seus controles, todas tratadas com DTT (20 mM e 50 mM) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm. ...	110
Figura 13: Efeito de agente redutor 2-Mercaptoetanol, na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. O redutor nas diluições de 20 mM e 50 mM foi pré-incubado com as amostras por 2 horas a temperatura ambiente, antes da adição de luminol. Quando as amostras foram comparadas com seus controles não apresentaram diferenças significativas. Comprimento de onda de 431 nm.	111
Figura 14: Efeito do uso de quelantes, EDTA e EGTA, na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. Os quelantes, nas concentrações de 20 mM e 50 mM, foram pré-incubadas por 2 h a temperatura ambiente com as amostras de porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios, antes da adição de luminol. A- EDTA; B- EDTA. Quando as amostras foram comparadas com seus controles não apresentaram diferenças significativas. Comprimento de onda de 431 nm.....	112

Figura 15: Efeito do quelante Fenantrolina, na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. O quelante, nas concentrações de 20 mM e 50 mM, foi pré-incubadas por 2 h a temperatura ambiente com as amostras de porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios, antes da adição de luminol. Apenas as amostras PS, FC 50 mM e miracídios 20 e 50 mM, apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos seus controles ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.....	113
Figura 16: Efeito da oxidação e da alta temperatura na quimiluminescência.....	114
Figura 17: Estimativa da massa molecular por ultrafiltração. A- Quimiluminescência obtida em amostras PS e miracídios após ultrafiltração em membrana de 10 kDa. B- Quimiluminescência obtida em amostras PS e miracídios após ultrafiltração em membrana de 3 kDa. “Concentrado” se refere ao material retido nas membranas, “ultrafiltrado” se refere ao material que passou pelos poros das membranas. Das amostras testadas, apenas o ultrafiltrado de miracídios (membrana de 10 kDa e 3 kDa) e ultrafiltrado de PS (membrana de 3 kDa) apresentaram diferenças significativas quando comparadas com os seus controles ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.	116
Figura 18: Grupo 1 - Swiss roll. Representação gráfica da técnica <i>Swiss roll</i> utilizada para o processamento de 5 intestinos de camundongos, após fixação em formalina 10%.	128
Figura 19: Grupo 2 - Cortes transversais. Representação gráfica das secções transversais de amostras com 5 mm de espessura provenientes do duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto.	128
Figura 20: Passagem de ovos de <i>S. mansoni</i> se dá ao longo de todo o intestino de camundongos. Grupo 1 - Swiss Roll. Registro em microscópio, aumento 4x, coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Nas imagens as setas indicam granulomas e agregação (<i>cluster</i>) de ovos de <i>S. mansoni</i> , no intestino delgado (A e B) e no intestino grosso (C e D).	131
Figura 21: Cortes histológicos revelam fenômeno de agregação (<i>cluster</i>) de ovos na parede intestinal. Grupo 2 - Cortes transversais. Registro em microscópio Zeiss Axioskop 40, aumento 4x. A - Intestino delgado, porção do duodeno, as setas indicam	

local com eusínofilia aumentada e agregação de mais de oito ovos de *S. manoni* passando por microvilosidades; B - Intestino delgado, porção do jejuno, as setas indicam ovos passando por microvilosidades; C - Intestino delgado, porção do íleo, setas indicam passagem de ovos em linha e eusínofilia alterada; D - Intestino grosso, porção do ceco, setas indicam granuloma bem formado contendo ovos, e ovos iniciando passagem pelas microvilosidades intestinais; E - Intestino grosso, porção do cólon, a seta indica passagem de mais de cinco ovos por microvilo em região com eusínofilia aumentada; F - Intestino grosso, porção do reto, a seta indica ovos próximo à camada basal do epitélio.....132

Figura 22: Passagem de ovos de *S. mansoni* pela parede do endotélio intestinal mostrando um espaço irregular em torno dos ovos. Corte transversal de intestino grosso. Imagens registradas por microscopia confocal, com laser no comprimento onda 405 e 488 nm em aumento 20x. As setas indicam ovos que já se encontram no sedimento fecal (a) e no momento da passagem pelo endotélio intestinal (b). Em ambos, é possível observar um espaço irregular em torno dos ovos (*)......133

Figura 23: Imunofluorescência indireta retrata secreção da proteína Sm 16 durante passagem de ovos pela parede do endotélio intestinal. Corte transversal de intestino grosso, obtido de camundongo após 50 dias de infecção por *S. mansoni*. Grupos controle (A, B, C) e Sm16 (A, B, C), submetidos à Imunofluorescência indireta, com imagens registradas por microscopia confocal, com laser no comprimento onda 405 e 488 nm. As setas indicam ovos, no momento da passagem pelo endotélio. Registro em aumento 20x.....134

Figura 24: Aprimoramento da metodologia Helmintex. Representação esquemática do aprimoramento da metodologia Helmintex, com a utilização de solução de luminol em apenas 100 µL do sedimento final, para discriminar amostras positivas e negativas, e posterior confirmação da parasitose e quantificação dos ovos, utilizando coloração de ninidrina e visualização em microscopia óptica de todo sedimento final.....138

Figura 25: Fenômeno de agregação de ovos de *S. mansoni*. Imagens obtidas por microscópio invertido de cultivo *in vitro* de vermes de *S. mansoni*, aumento 20x. Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2014.....206

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de metais por ICP-MS de 10.000 miracídeos e porção PS	117
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

CL- Quimiluminescência

DTT - Ditioneitol

EDS - *Energy Dispersive Spectroscopy*

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA - Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

ETT - Escritório de transferência de Tecnologia

F - ovos - Ovos obtidos de fígados de camundongos

FC - Fragmentos de cascas

FH - ovos - Ovos de fezes humanas

FH - ovos - PMP - Ovos de fezes humanas com partículas paramagnéticas

HTX - Helmintex[®]

HE - Hematoxilina-Eosina

ICP - MS - *Inductively coupled plasma-mass spectrometry*

KK - Kato - Katz

LAPSE - Laboratório de Síntese e Análise de Produtos Estratégicos

NTDs - *Neglected Tropical Diseases*

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPG - Ovos por grama de fezes

PBS – Phosphate-buffered Saline

POC - CCA - *Point-of-care test for detecting schistosome circulating cathodic antigen*

PS - Porção Solúvel

RLU - *Rectified linear unit*

RBS - *Rutherford backscattering spectroscopy*

SEM - *Scanning Electron Microscope*

UV - Ultravioleta Visível

WHA - *World Health Assembly*

LISTA DE SÍMBOLOS

Au - ouro

Ba - bário

C - carbono

Ca - cálcio

Cl - cloro

Co₂ - carbono

Cu - cobre

Fe - ferro

Fe²⁺ - íon ferroso

G - gramas

g/L - grama por litro

h - hora

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

KOH - hidróxido de potássio

kV - quilovolts

min - minuto

M - molar

MeV - megaelétron - volt

Mg - magnésio

MG - miligramas

mL - mililitros

mM - milimolar

mm - milímetro

mm² - milímetros quadrados

Mn - manganês

mol/L - mol por litro

MV - megavolts

Ni - níquel

nm - nanômetro, unidade de comprimento de onda, também representado pela letra grega (λ)

O - oxigênio

P - fósforo

® - marca registrada

S - enxofre

Si - silício

v/v - volume/volume

Un/ μ L - Unidade/microlitro

x g - força de gravidade

Zn - zinco

° - graus

°C - graus Celsius

μ L - microlitro

μ g - micrograma

ug/10K - microgramas por 10.000 miracídios

ug/L - microgramas por litro da amostra

μ g - micrograma

μ m - micrômetro

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1. A esquistossomose	25
2.2. Carga parasitária e prevalência da esquistossomose	26
2.3. <i>Schistosoma mansoni</i>	27
2.4. O ciclo biológico	27
2.5. Os ovos	28
2.6. Etapas da infecção e fisiopatologia	31
2.6.1. Mecanismos	31
2.6.2. Fisiopatologia	33
2.7. Controle e eliminação	33
2.8. Diagnóstico	35
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVO GERAL DO DOUTORADO	37
CAPÍTULO I	38
Otimização do método Helmintex para o diagnóstico de esquistossomose.	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. OBJETIVO GERAL	41
3. ARTIGO I	42
4. ARTIGO II	49
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	60
CAPÍTULO II	62
Uma nova estratégia diagnóstica utilizando o sistema Luminol-H ₂ O ₂ na detecção de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> em sedimento produzido pelo método Helmintex.....	62
1. INTRODUÇÃO	63
2. OBJETIVO GERAL	67
3. ARTIGO I	68

4. ESTUDOS COMPLEMENTARES SOBRE O(S) COMPOSTO(S) RESPOSÁVEL(ÉIS) PELA QUIMILUMINESCÊNCIA EM OVOS DE <i>S. mansoni</i> ...	95
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	118
CAPÍTULO III	122
Passagem de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> pela parede do intestino de camundongos.	122
1. INTRODUÇÃO	123
2. OBJETIVO GERAL	126
3. MATERIAIS E MÉTODOS	127
4. RESULTADOS	130
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	135
CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
PERSPECTIVAS.....	139
ASPECTOS ÉTICOS	140
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO A - Certificação de adição de invenção	157
ANEXO B - Aprovação CEUA.....	161
ANEXO C - Parecer consubstanciado do CEP - Estância/SE	162
ANEXO D - Aprovação SIPESQ	165
ANEXO E - Artigo publicado no ano de 2018 na revista PLOS Neglected Tropical Diseases, em colaboração com professor Dr. Stefan Michael Geiger - UFMG.	166
ANEXO F - Artigo publicado no ano de 2018 na revista PLOS Neglected Tropical Diseases, colaboração com grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS.	189
ANEXO G - Imagens obtidas pelo grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, demonstrando fenômeno de agregação (<i>cluster</i>) em ovos de <i>S. mansoni</i> , durante manutenção de vermes <i>in vitro</i>	206
ANEXO H - Certificado de curso ministrado – Metodologia Helmintex.....	207
ANEXO I - Teste de quimiluminescência utilizando luminol desenvolvido pela LAPSE/UFRJ, com mensuração em Luminômetro.....	208

ANEXO J - Declaração de avaliadora do Espaço Jovem Cientista, anos 2017 e 2018.	214
ANEXO L - Colaborações	216

1. PREFÁCIO

Em janeiro de 1997, um paciente homem, residente do município de Esteio (RS), de meia idade, dava entrada em um hospital do município de Sapucaia (RS) com sintomatologia que levava a um diagnóstico inicial de hepatite. Dentre vários exames, os realizados com fezes (método de sedimentação espontânea), revelaram a existência de ovos de *Schistosoma mansoni*. Após o conhecimento deste caso, estudos realizados pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS no município de Esteio, através da investigação epidemiológica da rede de contatos do caso índice, comprovaram a existência de um foco de esquistossomose no município de Esteio. Ao longo de 21 anos, este achado proporcionou ao Grupo de Biologia Parasitária não só mais uma linha de pesquisa, mas inúmeras parcerias consolidadas nacionais e internacionais e trabalhos publicados. Um deles, publicado no ano de 2007, buscava suprir a deficiência diagnóstica de testes já consolidados em áreas onde a carga de ovos eliminados nas fezes é muito baixa, fato encontrado no município de Esteio. Denominado Helmintex[®], a nova metodologia apresenta uma sensibilidade de 100% para cargas maiores do que 1.3 ovos por grama de fezes (OPG). Para alcançar esta sensibilidade a metodologia foi desenvolvida a partir da utilização de grande quantidade de fezes (30 gramas) que passam por vários passos de concentração, terminando com o isolamento dos ovos através de sua interação com partículas paramagnéticas em um campo magnético (Teixeira *et al.*, 2007).

Um estudo realizado no município de Januária (MG) com 270 indivíduos (Oliveira *et al.*, 2018) e outro no município de Estância (SE) com 461 indivíduos (Lindholz *et al.*, 2018) confirmaram a alta sensibilidade do Helmintex[®] como método diagnóstico para detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes em áreas endêmicas, apesar de dificuldades de sua aplicação em campo. Aqueles estudos (encontrados nesta Tese no ANEXO E) serviram de base para que o Ministério da Saúde adotasse o Helmintex[®] como padrão de referência para avaliar a eficiência no Brasil de um teste rápido de urina indicado pela Organização Mundial da Saúde (<http://www.pucrs.br/blog/orgao-publicos-reconhecem-metodo-diagnostico-de-esquistossomose/>). Por esse motivo, a

otimização do HTX tornou-se prioritária, com a busca de processos alternativos que possam reduzir o tempo de sua aplicação.

A presente Tese, dividida em três capítulos, tem como objetivo principal aprimorar o Helmintex[®] para diagnóstico da infecção por *S. mansoni* através da detecção de ovos nas fezes.

O Capítulo I da Tese, apresenta um aprimoramento do Helmintex[®], visando especialmente otimizar a etapa de leitura, focando na redução do sedimento final pela aplicação de detergente (Tween-20) e a coloração dos ovos de *S. mansoni* pela ninidrina, facilitando a visualização destes em meio ao sedimento espalhado sobre filtro de papel. A publicação destes dados em 2017 na revista *Experimental Parasitology*, com o título “Optimization of the Helmintex[®] method for schistosomiasis diagnosis”, estabeleceu uma nova versão para o método HTX. Sua aplicação em dois grandes estudos de campo, demonstraram que a sensibilidade do Helmintex[®] é pelo menos três vezes maior do que a sensibilidade do método de Kato-Katz, e descreveram as limitações do método POC-CCA (teste rápido de urina), para diagnosticar indivíduos com baixa carga parasitária. Por esse motivo, o método passou a ser recomendado como referência para diagnóstico de esquistossomose intestinal e para avaliação comparativa de testes parasitológicos.

No Capítulo II, buscou-se reduzir ainda mais a etapa de leitura do sedimento final Helmintex[®]. Trata-se de uma nova metodologia de detecção de ovos, baseada no uso da quimiluminescência (Luminol-H₂O₂) acoplada à detecção por espectrofotometria em apenas 100 µL de sedimento final Helmintex[®]. Tal inovação faz parte de um primeiro artigo sobre o tema, denominado “A new diagnostic strategy which uses a luminol-H₂O₂ system to detect *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments processed by the Helmintex method”, submetido à revista PNAS. Por possuir dados inéditos, hoje se encontra com pedido de invenção sob número de processo BR 1020170064786 (ANEXO A). O Capítulo ainda contempla informações substanciais obtidas através de inúmeros experimentos, sobre moléculas oriundas de ovos de *S. mansoni*, que possam ser responsáveis pela emissão de luz. A hipótese principal é de que tal fenômeno deve-se à existência de íons metálicos na casca de ovos e nos miracídios.

O Capítulo III, trata sobre um melhor entendimento da passagem dos ovos através da parede intestinal, e possibilidades de associações dos ovos em aglomerados e os mecanismos moleculares intervenientes nesta crítica etapa de saída no intestino do hospedeiro vertebrado. Embora esta seja uma questão biológica muito básica do ciclo do *S. mansoni*, a detecção dos ovos nas fezes, por métodos diagnósticos como o HTX, é inteiramente determinada pelo sucesso do processo de saída dos ovos através da parede intestinal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A esquistossomose

Em 1851, registrava-se pela primeira vez a esquistossomose, após a realização de uma autópsia pelo médico alemão Theodor Bilharz no Egito. Por este motivo, por muitos anos, a esquistossomose ficou conhecida como bilharziose (Jordan, 2000), termo hoje pouco utilizado (Ross *et al.*, 2002).

A esquistossomose é uma parasitose, que algumas vezes pode levar a uma doença crônica, considerada uma das infecções parasitárias mais prevalentes em humanos (Santos e Chaves, 1997), e uma das doenças tropicais mais importantes (Gray *et al.*, 2011; Bockarie *et al.*, 2013), pois atinge cerca de 78 países da África, das Américas, do Oriente Médio e do Sudeste Asiático (Gray *et al.*, 2011; Who, 2015). Globalmente, o risco de infecção atinge cerca de 779 milhões de pessoas (Steinmann *et al.*, 2006; Utzinger *et al.*, 2009); a infecção está presente em mais de 250 milhões de indivíduos em todo o mundo, onde 201,5 milhões destas, vivem na África (Steinmann *et al.*, 2006; Utzinger *et al.*, 2009; Hotez *et al.*, 2014). Está diretamente ligada a aspectos socioeconômicos, principalmente a pobreza e falta de saneamento básico (Barbosa *et al.*, 1996; Who, 2016). É causada por helmintos trematódeo do gênero *Schistosoma*, com seis espécies conhecidas, *S. hematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. malayensis*, *S. mansoni* e *S. mekongi* (Colley *et al.*, 2014; Who, 2015), mas apenas três delas são responsáveis pela infecção mais comuns em humanos: *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum* (Colley e Secor, 2017; McManus *et al.*, 2018). *Schistosoma mansoni* é a única espécie encontrada em áreas endêmicas nas Américas, que incluem quatro países: Brasil, Venezuela, Suriname e Santa Lúcia (Zoni *et al.*, 2016). O Brasil possui a área mais extensa e é responsável por 95% dos casos (WHO, 2010). No entanto, registros do Ministério da Saúde indicam que, desde 2014, a porcentagem de casos identificados através de inquéritos de busca em municípios endêmicos tem decrescido gradualmente (Ministério da Saúde 2014). O recente inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e

Geohelmintoses (INPEG) estima que o total de casos no país não ultrapassa dois milhões (Katz, 2018).

No Brasil, sua distribuição atinge principalmente várias áreas de Estados da região Nordeste e o norte de Minas Gerais, no entanto, são encontrados focos isolados de transmissão nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2013). Na região Sul, o primeiro caso autóctone da doença foi descoberto em janeiro de 1997, em um paciente hospitalizado no município de Sapucaia e residente em Esteio (Graeff-Teixeira *et al.*, 1999). Desde então, o Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS vem estudando e monitorando este foco, se envolvendo diretamente em estudos que visam otimizar métodos diagnósticos de alta sensibilidade para a esquistossomose.

2.2. Carga parasitária e prevalência da esquistossomose

Na maioria das parasitoses, em especial para esquistossomose, a quantidade de ovos nas fezes tem correlação direta com a quantidade de vermes adultos existentes no paciente. Sendo assim, a carga parasitária é indicada pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (Tarafer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2012). Desta forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS), baseada em exames de Kato-Katz obtidos a partir de uma amostra de fezes em duas lâminas, classifica os indivíduos infectados em três categorias, de acordo com a intensidade da infecção: leve ou baixa (1 a 99 OPG), moderada (100 a 399 OPG) e alta ou grave (≥ 400 OPG). Dos quais, o percentual de casos com intensidade alta (≥ 400 OPG) é preconizado pela OMS, como indicador das metas para “controle de morbidade” (< de 5% de casos com OPG > 400) e “eliminação como problema de saúde pública” (< de 1% de casos com OPG > 400) (WHO 2013).

Estudos realizados em 2016 revelam que a carga global da esquistossomose é estimada em 1,9 milhões de anos de vida, ajustados por incapacidade (Hay *et al.*, 2017), dado alarmante, visto que na maioria das áreas endêmicas geralmente a infecção inicial ocorre em crianças a partir de 2 anos, e nestas, pelas inúmeras infecções que terão, calcula-se que a carga parasitária crescerá durante os próximos 10 anos de vida (Colley *et al.*, 2014). Por este motivo, a maior prevalência e intensidade de

infecção são comumente descritas em adolescentes (Hotez e Kamath, 2009; Colley *et al.*, 2014), e são classificadas em três categorias: alta prevalência ($\geq 50\%$ infectados), moderada prevalência ($\geq 10\%$ e $< 50\%$ infectados) e baixa prevalência ($< 10\%$ infectados) (WHO, 2002).

2.3. *Schistosoma mansoni*

Os esquistossomos, ao contrário de outros trematódeos, apresentam sexos separados. Os vermes adultos possuem corpo cilíndrico com cor branca ou acinzentada, com 7-20 milímetros (mm) de comprimento, apresentado duas ventosas terminais, um tegumento complexo, um trato digestivo de fundo cego e órgãos reprodutores (Gryseels *et al.*, 2006). O macho ainda apresenta um sulco longitudinal ou canal ginecóforo, no qual ele retém a fêmea, mais longa, cilíndrica e mais fina (Gryseels *et al.*, 2006). O parasito apresenta diferentes estágios de desenvolvimento: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto (Souza *et al.*, 2011), possuindo longevidade de três a cinco anos, podendo chegar a 30 anos (Hinrichsen, 2005; Prata, 2007).

2.4. O ciclo biológico

O ciclo possui duas fases parasitárias: uma infectante do hospedeiro intermediário, molusco da espécie *Biomphalaria glabrata*, e outra infectante do hospedeiro definitivo, humano (Neves *et al.*, 2010). Na água, os ovos maduros sofrem influência da baixa osmolaridade do meio, de estímulos luminosos e temperatura, o que leva a intensos movimentos do miracídio, resultando na ruptura da casca do ovo e liberação do miracídio, que nada em direção a seu hospedeiro intermediário. Dentro do molusco, os miracídios se transformam em esporocistos e fazem reprodução assexuada, produzindo esporocistos filhos, e destes se origina um grande número de cercárias. Passados 30 dias, as cercárias emergem do molusco em resposta à luz e calor (Figura 1) (MacManus *et al.*, 2018).

A infecção em humanos ocorre pelo contato com água contaminada por cercárias, que penetram na pele intacta (Ross *et al.*, 2001; Gryseels *et al.*, 2006). No momento da penetração, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que migram pela circulação sanguínea até o sistema porta hepático, onde irão amadurecer e transformar-se em vermes adultos dentro de 25-28 dias (Coura, 2007).

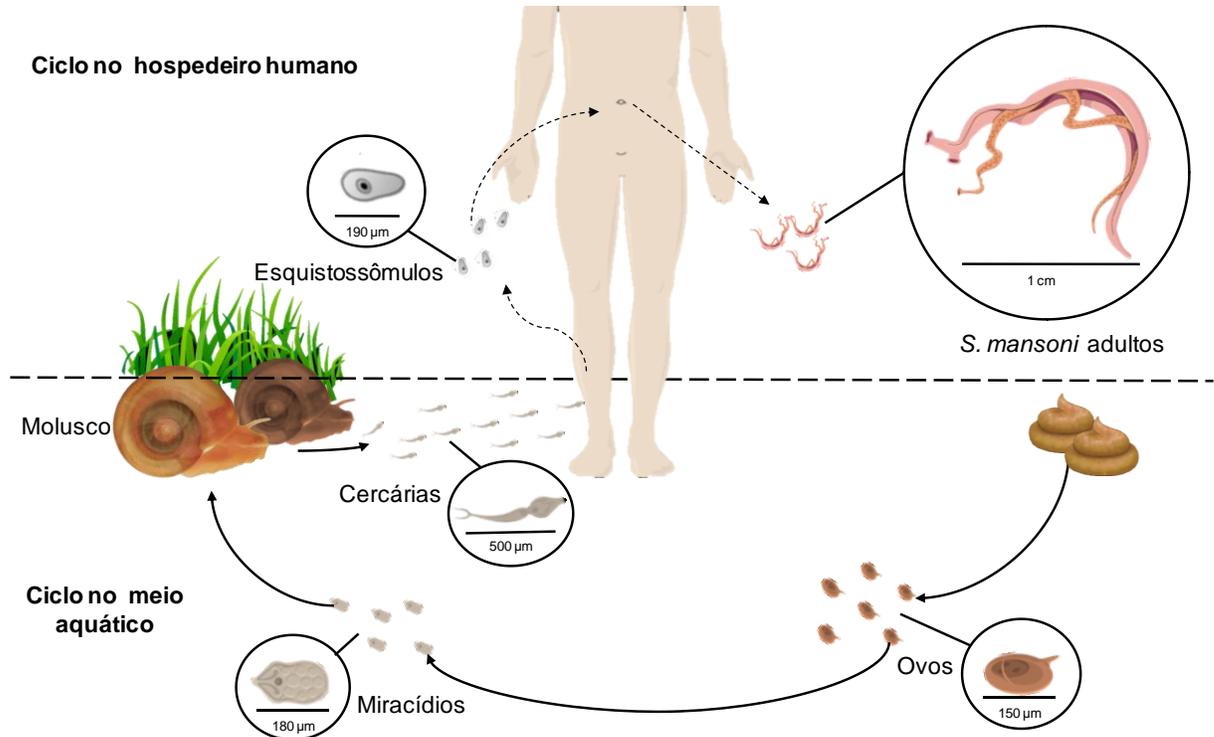


Figura 1: Ciclo biológico do *S. mansoni* (Adaptado pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2018).

2.5. Os ovos

O ovo do *S. mansoni* mede aproximadamente 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, com polo anterior delgado e posterior volumoso, possuindo um espinho (espículo) lateral saliente e agudo, característico da espécie (Figura 2) (Ford e Blankespoor, 1979; Karl *et al.*, 2013). A eliminação diária de ovos pelas fêmeas, no interior das vênulas mesentéricas inferiores, é de 300 ovos imaturos (Prata, 1957; Pellegrino e Goelho, 1978; Rey, 2001), outros autores relatam 350 ovos, (Cheever *et*

al., 1994). Uma vez eliminados, para chegar à luz do intestino, atravessam o endotélio, a membrana basal das veias, e o epitélio do intestino.



Figura 2: Imagem de ovos de *S. mansoni* em microscopia em sedimento Helmintex[®]. Microscopia óptica de 20 x. Imagem obtida pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2012.

A maturação dos ovos de *S. mansoni* ocorre em duas etapas pré-embriônicas dentro da fêmea, e oito estágios embriônicos após a postura dos ovos (Jurberg *et al.*, 2009). Recém depositados, os ovos não possuem estruturas complexas entre a casca e o embrião (Neill *et al.*, 1988), assim sua maturação, que simplesmente consiste da casca do ovo reticulado em torno do óvulo e das células vitelínicas, leva cerca de uma semana, e quando maduros são transportados e eliminados para o lúmen intestinal (Lenzi *et al.*, 1991). A estimativa é que um terço desses ovos percorra este caminho para a luz do intestino, com o objetivo de completar o ciclo. Os demais ao falharem no processo de aderir e penetrar na parede dos vasos seguem o fluxo sanguíneo (DeWalick *et al.*, 2011).

A casca de ovos maduros, eliminados nas fezes, apresenta aspecto liso quando visualizados em microscopia óptica. Porém, quando visualizados em microscopia eletrônica de varredura (MEV), a casca apresenta-se com uma aparência granulada devido à presença de irregularidades e microfilamentos, que formam uma espécie de tapete sobre a superfície (Figura 3) (Neill *et al.*, 1988; Karl *et al.*, 2013). As cascas dos ovos de *S. mansoni* apresentam-se endurecidas com coloração marrom-claro-transparente, devido principalmente a ligações cruzadas de proteínas quinonas, que

são dependentes da atividade da tirosinase (Mathieson e Wilson, 2010; DeWalick *et al.*, 2011). A tirosinase é uma glicoenzima que contém cobre (Cu), e desenvolve um papel importante no mecanismo de reticulação da casca do ovo de *S. mansoni* durante toda a sua maturação (Seed *et al.*, 1978; Cordingley, 1987; Fitzpatrick *et al.*, 2007). Aproximadamente um terço das proteínas encontradas nas cascas dos ovos de *S. mansoni*, obtidos de fígado, são proteínas celulares comuns, entre elas a p40, HSP-70, enolase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), precursor de superóxido dismutase, e tiorredoxina peroxidase (Mathieson e Wilson, 2010; DeWalick *et al.*, 2011).

A superfície dos ovos de *S. mansoni* também é rica em carboidratos, o que lhes confere características extremamente dinâmicas, permitindo diversas interações entre o parasita e o hospedeiro (Abdul-Salam e Mansour, 2000). Os ovos, além de produzirem glicoproteínas, e antígenos glicolipídicos, também produzem oligossacarídeos não conjugados únicos, não detectados em meio de cultura (Robijn *et al.*, 2007)

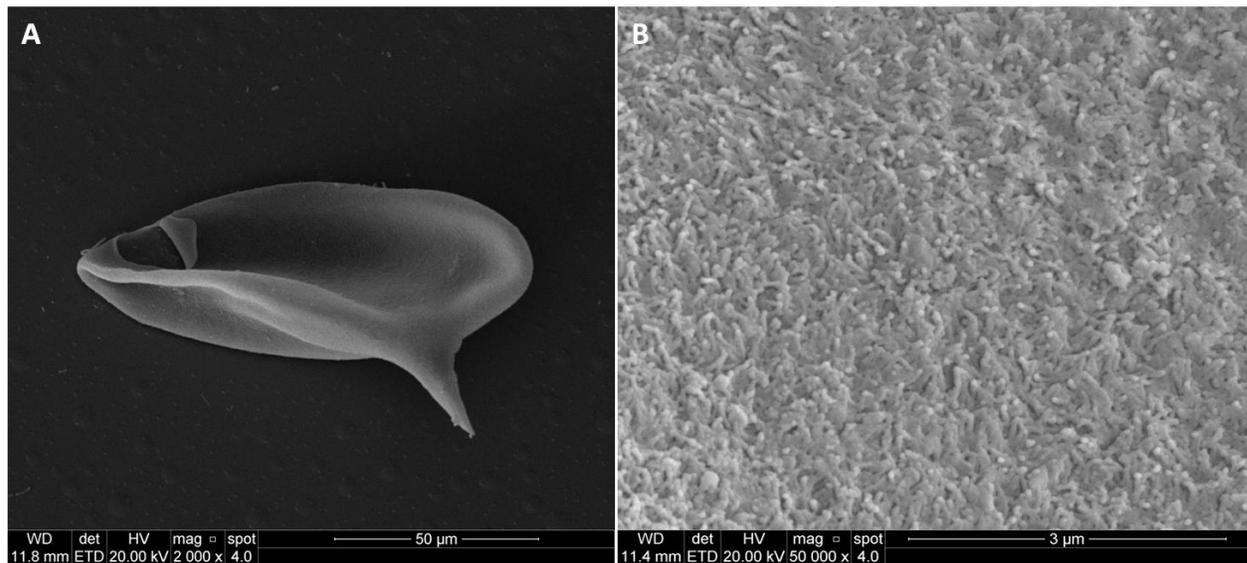


Figura 3: Ovo de *S. mansoni* visualizado em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A:** Imagem do ovo inteiro. **B:** Superfície do ovo com uma aparência granulada devido à presença de irregularidades e microfilamentos. Imagem obtida pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2016.

2.6. Etapas da infecção e fisiopatologia

Se não for tratada, a esquistossomose pode resultar, em uma minoria dos infectados, em morbidade grave e até em mortalidade. Embora haja controvérsias quanto a extensões exatas da morbi-letalidade, hoje se reconhece que a esquistossomose sempre influencia negativamente a qualidade de vida, como uma patologia inflamatória sistêmica crônica, mesmo na ausência das formas clínicas graves classicamente descritas (King *et al.*, 2005; McManus *et al.*, 2018).

A maioria das lesões causadas pela esquistossomose mansoni é influenciada pela resposta imunitária induzida e seus efeitos na formação de granulomas (Dunne e Pearce, 1999; Cheever *et al.*, 2000), sendo os ovos de *S. mansoni* considerados os elementos centrais na patogênese, devido à excreção de proteínas quando maduro (Prata, 1957; DeWalick *et al.*, 2011).

2.6.1. Mecanismos

Três estágios gerais caracterizam a progressão da infecção:

Estágio agudo: Após a penetração na pele, parte das cercárias irá morrer na pele, enquanto as restantes ganham a circulação venosa através de pequenos vasos sanguíneos, ou entrando em vasos linfáticos, sendo transportadas por vasos sanguíneos para o local de maturação dos vermes adultos, no fígado. (Ross *et al.*, 2007).

Na pele, nas primeiras 12 horas (h), a resposta imune inata a larvas mortas, pode originar reações de hipersensibilidade e causar uma reação prurítica maculopapular, chamada dermatite cercariana (Lichtenbergová *et al.*, 2008). Esta reação é predominantemente constituída por leucócitos mono e polimorfonucleares e se apresenta clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso (Mahmoud, 2009), cuja intensidade depende do número e duração das exposições, e ao estado imunológico do hospedeiro (Lichtenbergová *et al.*, 2008). Durante a passagem pela epiderme e derme, ocorre reação de hipersensibilidade do tipo imediata com ativação de vários componentes da resposta imune inata. Em dois dias, organiza-se um infiltrado

de polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans, além de produção local de quimiocinas – CCL3/ MIP-1a – e citocinas – IL-1b, IL-6, IL-12p40, IL-10 (IL = interleucina) (Hogg *et al.*, 2003).

As formas clínicas da esquistossomose aguda geralmente ocorrem entre duas semanas e três meses após o contato, em indivíduos expostos pela primeira vez (Ross *et al.*, 2007). Raramente observada em populações de áreas endêmicas devido à dessensibilização *in útero* (King *et al.*, 1998) ou possivelmente devido à exposição repetida à penetração de cercárias na pele induzindo produção de IL-10 por células T CD4 + na pele, que resulta em resposta imune reguladora (Sanin *et al.*, 2015).

Os sintomas muitas vezes acompanhados de eusinofilia e infiltrados pulmonares (Gryseels *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2007; Clerinx e Van Gompel, 2011), são causados por reações de hipersensibilidade sistêmica e formação de imunocomplexos em resposta a antígenos liberados durante a migração de esquistossômulos, ou no início da deposição de ovos (Ross *et al.*, 2007).

Infecção ativa estabelecida: A infecção se estabelece com a maturação dos vermes adultos, iniciando-se a produção e excreção de ovos (Colley e Secor, 2014). Os vermes adultos, que residem nas veias mesentéricas inferiores, possuem mecanismos de escape das reações imunológicas do hospedeiro, por exemplo, através da mimetização da sua superfície externa (Melo e Coelho, 2005).

As principais lesões e sintomas relacionados à esquistossomose mansoni estão relacionados a respostas inflamatórias contra os ovos dos parasitas que ficam retidos nos tecidos (Coura, 2000; Souza *et al.*, 2011). Os ovos liberam antígenos solúveis que induzem à destruição do tecido circunjacente por ação lítica, e levam a uma reação inflamatória granulomatosa (Nascimento-Carvalho e Moreno-Carvalho, 2005). O fígado é o principal órgão afetado, por ser a primeira barreira mecânica para ovos não eliminados nas fezes e que seguem centripetamente o fluxo do sangue venoso mesentérico, exibindo diferentes graus de lesões inflamatórias destrutivas e obstrutivas dos ramos do sistema porta intra-hepático (Andrade e Bina, 1983).

As populações que correm o maior risco de lesões graves, pela frequência de exposição em cursos d'água, englobam crianças e adolescentes (Casavechia *et al.*, 2018), nos quais a infecção crônica pode resultar em anemia, fibrose intestinal e

hepática, esplenomegalia e complicações neurológicas (Gryseels *et al.*, 2006; Colley e Secor, 2014; Organization, 2014). Estes sintomas são inteiramente reversíveis após tratamento e remoção dos vermes (Gryseels *et al.*, 2006).

Infecção crônica tardia: Em áreas endêmicas, a maioria das pessoas estão continuamente expostas à infecção e gradualmente, diminuem sua carga parasitária após o início da adolescência, à medida que novas infecções se sucedem com gradual incremento de eficácia da resposta imune (Wilkins *et al.*, 1984). A resposta imune na infecção crônica tardia é gradativamente modulada para menor reatividade, diminuindo assim o tamanho dos novos granulomas, e levando a uma melhor resolução dos granulomas prévios (McManus *et al.*, 2018).

2.6.2. Fisiopatologia

Durante os estágios ativo, estabelecido, e crônico tardio, a gravidade dos sintomas geralmente está correlacionada com a intensidade da infecção, podendo gerar morbidade órgão-específica devido ao acúmulo de ovos e ao desenvolvimento de fibrose (Ross *et al.*, 2007). Na esquistossomose intestinal, associada a ovos aprisionados em tecido intestinal, é possível verificar a indução de inflamação granulomatosa da mucosa, com surgimento de microulcerações, sangramento superficial e por muitas vezes, pseudopolipose (Gryseels *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014). Já na esquistossomose hepatoesplênica, granulomas formados ao redor de ovos presos no tecido periportal e pré-sinusoidal causam substancial aumento do baço e do fígado (Vennervald *et al.*, 2004; Gryseels *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2011). Em algumas pessoas, os granulomas resultam em fibrose periportal grave, com deposição de colágeno em torno da veia porta, oclusão dos ramos portais menores e patologia severa, irreversível em muitos casos (Lambertucci *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 2011).

2.7. Controle e eliminação

O consenso em relação a doenças tropicais negligenciadas (NTDs) como a esquistossomose é de que o controle pode ser realizado de forma coordenada com o tratamento coletivo das populações, utilizando medicamentos seguros administrados

em intervalos regulares independentemente de diagnóstico individual prévio (quimioterapia preventiva ou quimioprofilaxia) (WHO, 2017). Este consenso foi definido pela resolução 54.19, aprovada no ano 2001 pela Assembleia Mundial da Saúde (WHA 54.19), que reconhece a importância do fornecimento de água potável, saneamento básico e da quimioterapia repetida com medicamentos seguros, de dose única em intervalos regulares, especialmente das crianças (WHO, 2002).

A resolução WHA 54.19, levou a criação de uma nova Resolução no ano de 2012, a WHA 65.21, que prevê a interrupção da transmissão da esquistossomose (Secor e Colley, 2018). A Resolução WHA 65.21 prevê o tratamento regular de pelo menos 75% das crianças de áreas endêmicas até o ano de 2020 (WHO, 2015), o fornecimento de água potável, saneamento e higiene (WHO, 2018), o controle de caramujos e acima de tudo, métodos diagnósticos mais sensíveis, já que as intensidades das infecções diminuem, devido à quimioterapia repetida, aproximando-se dos limites de sensibilidade para as técnicas recomendadas (Yu *et al.*, 1998).

Todos estes objetivos previstos pela WHA 65.21 trouxeram à tona pela primeira vez a possibilidade real de eliminação da esquistossomose (Bergquist *et al.*, 2017). Mas para que este objetivo seja alcançado os esforços de todos os países endêmicos devem ir além das medidas de controle biomédico, incluindo o desenvolvimento social e econômico, traduzido em amplo fornecimento de água e saneamento, sustentados até a certificação da eliminação (Secor e Colley, 2018).

O Brasil é signatário da resolução WHA 65.21, por esta razão, o Ministério da Saúde assumiu o compromisso de cumprir os objetivos estratégicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) 2012-2020 (Cabello *et al.*, 2016). Estes objetivos são reduzir a prevalência de infecção de intensidades altas ($OPG \geq 400$) para menos de 5% até 2020 (controle de morbidade) e para menos de 1% até 2025 (eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública). Dadas às peculiaridades epidemiológicas e as políticas de saúde pública do Brasil, as diretrizes para controle de morbidade ressaltam a identificação precoce e o tratamento oportuno dos portadores de infecção, em vez da administração em massa de praziquantel (Ministério da Saúde, 2014; Favre *et al.*, 2015). Além disso, a fim de eliminar a transmissão da esquistossomose, o Ministério da Saúde (2014) considera essencial implementar

medidas preventivas incluindo educação em saúde, saneamento ambiental e mobilização comunitária, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

2.8. Diagnóstico

O diagnóstico padrão confirmatório da esquistossomose é feito através da direta visualização dos ovos nas fezes do indivíduo (Knopp *et al.*, 2011; Albonico *et al.*, 2012; Levecke *et al.*, 2014). Como alternativa, são utilizados imunodiagnósticos (Cesari *et al.*, 2005; Sulahian *et al.*, 2005), detecção de DNA (Sandoval *et al.*, 2006), e detecção direta de antígenos no soro (Van Lieshout *et al.*, 2000). Embora estes métodos sejam úteis devido à eficácia e rapidez no diagnóstico, em áreas de baixa prevalência, estes não estabelecem a intensidade da infecção, e muitos deles não servem como diagnóstico da infecção ativa, uma vez que os resultados das provas imunológicas podem permanecer positivos por muito tempo, mesmo após o tratamento da infecção (Sturrock, 2001).

A técnica coprológica conhecida como Kato-Katz (KK), que consiste na clarificação de 42 miligramas (mg) de fezes cobertas por uma lâmina de celofane embebida em verde de malaquita (Katz *et al.*, 1972), é recomendado por programas de controle em áreas de moderada a alta intensidade de infecção e prevalência. Devido ao seu uso extensivo, foi estabelecida como parte das diretrizes da OMS para programas de controle de morbidade (Who, 2011). No entanto, em áreas de baixa intensidade de infecção e prevalência, esta técnica demonstrou grande variabilidade (De Vlas e Gryseels, 1992; Kittur *et al.*, 2016). Devido a este fato, o método KK pode levar à ocorrência de diagnósticos falso-negativos e o não estabelecimento da real prevalência (Enk *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, diversos estudos relatam o uso de um teste diagnóstico indireto como alternativa aos métodos parasitológicos diretos para o diagnóstico de *S. mansoni*, denominado Antígeno Catódico Circulante (POC-CCA) (Shane *et al.*, 2011; Stothard *et al.*, 2011; Coulibaly *et al.*, 2013), com capacidade de detecção de glicoproteínas do esquistossomo na urina do hospedeiro (Deelder *et al.*, 1994; De Clercq *et al.*, 1997; Disch *et al.*, 1997; Polman *et al.*, 1998; Coulibaly *et al.*, 2013). As principais vantagens do POC-CCA incluem seu fácil manuseio sob condições de

campo, e requisitos mínimos de treinamento prático para sua aplicação (Colley *et al.*, 2017). Estudos realizados no Quênia (Verani *et al.*, 2011), Uganda (Sousa-Figueiredo *et al.*, 2010; Stothard *et al.*, 2011) e Costa do Marfim (Coulibaly *et al.*, 2013) relatam que o POC-CCA é até seis vezes mais preciso do que a técnica de Kato-Katz, (Kittur *et al.*, 2016). Entretanto, a especificidade do POC-CCA é influenciada pela reação cruzada com outras infecções por helmintos, produzindo falsos positivos, especialmente em áreas de prevalência moderada e baixa (Lodh *et al.*, 2013), podendo levar a uma superestimação da prevalência (Colley *et al.*, 2017).

É importante enfatizar que a OMS recomenda atualmente tanto o KK (1 amostra, 2 lâminas) e o POC-CCA para controle de morbidade (não eliminação) da esquistossomose mansoni. Entretanto, é seguro afirmar que nem o KK e nem o POC-CCA podem detectar todos os casos de infecção por *S. mansoni* em uma área, sendo necessária a utilização de mais um teste, sensível e específico para fins de diagnóstico, que possa ser usado como “padrão de referência”.

Em 2007, uma técnica coproparasitológica que utiliza uma amostra de 30 gramas de fezes foi relatada pela primeira vez. Denomina Helmintex[®] (Teixeira *et al.*, 2007), a nova metodologia trouxe avanço significativo para a detecção de ovos de *S. mansoni* em áreas onde as cargas parasitárias encontram-se reduzidas. Sua recente otimização (Favero *et al.*, 2017) e aplicação em dois estudos de campo, confirmaram sua alta sensibilidade (Oliveira *et al.*, 2018; Lindholz *et al.*, 2018). Além de permitir a comparação entre o KK (1 amostra, 2 lâminas) e o POC-CCA (uma amostra de urina) usando a metodologia Helmintex (1 amostra de 30 gramas (g) de fezes) como referência, revelando que as vantagens da metodologia Helmintex superam suas dificuldades operacionais, deixando claro inclusive que o Índice de Utilidade Clínica (CUI) do POC-CCA é menor (54%) do que do KK (70,9%) (Lindholz *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

Após 21 anos da descoberta do foco de esquistossomose mansônica no município de Esteio/RS, que conduziu o Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS a desenvolver, patentear e publicar no ano de 2007 a metodologia Helmintex[®], a resolução WHA 65.21 no ano de 2012, trouxe à tona a importância de métodos diagnósticos mais sensíveis para a eliminação da esquistossomose.

Mesmo com sensibilidade de 100% para cargas acima de 1,3 OPG (Teixiera *et al.*, 2007), muitos aspectos da metodologia Helmintex[®] vem sendo otimizados nos últimos anos para torná-la menos trabalhosa e, se possível, ainda mais eficaz. A grande quantidade (30 g) de fezes examinada, os diversos processos de limpeza e concentração, o conseqüente esforço de redução e limpeza do sedimento, e a demora na leitura de todo o sedimento final são obstáculos técnicos a serem superados, sempre garantindo a alta sensibilidade do método.

Portanto, é razoável concordar que a metodologia necessita de adequações para melhorar sua aplicabilidade no laboratório, e eventualmente em campo, com menor complexidade e tempo de processamento. Por este motivo, no presente estudo a otimização da metodologia Helmintex[®] visou especialmente simplificar e reduzir o tempo para detecção dos ovos. Também investigamos o fenômeno da passagem de ovos de *S. mansoni* pela parede intestinal, o que vai determinar a eliminação dos ovos no ambiente.

4. OBJETIVO GERAL DO DOUTORADO

Aprimorar a metodologia de detecção de ovos da metodologia Helmintex[®] para o diagnóstico da esquistossomose mansoni.

CAPÍTULO I

Otimização do método Helmintex para o diagnóstico de esquistossomose.

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose, causada por parasitos do gênero *Schistosoma* é ainda uma infecção prevalente, apesar dos esforços para controle de sua disseminação (Chitsulo *et al.*, 2000). O diagnóstico se baseia na identificação dos ovos do parasita nas fezes de indivíduos infectados (Albonico *et al.*, 2012; Levecke *et al.*, 2014). No entanto, a maioria dos métodos atualmente utilizados no diagnóstico não apresenta sensibilidade suficiente em áreas de carga parasitaria baixa (Corachan, 2002; Noya *et al.*, 2002). O método Helmintex[®] (Teixeira *et al.*, 2007) foi desenvolvido para detecção de pequenos números de ovos de *S. mansoni*, o que costuma ocorrer em áreas com baixa intensidade de transmissão. Este método utiliza uma grande quantidade de fezes que são processadas por vários passos de concentração e, em sua etapa final, os ovos são isolados em um campo magnético, após incubação com partículas paramagnéticas. Todas estas etapas trouxeram ao método alta sensibilidade. Porém, a realização de toda metodologia demanda tempo e esforço para conclusão do resultado.

O presente Capítulo descreve o desenvolvimento dos experimentos para a incorporação de: 1) um detergente não iônico, estável e não tóxico, utilizado em inúmeras aplicações domésticas e científicas e farmacológicas conhecido como Tween-20 (Helenius *et al.*, 1979), para melhor homogeneização, redução de gorduras e grumos de sedimento fecal; 2) enzima celulase, que hidrolisa celulose, um polissacarídeo formado por várias unidades de glicose, muito utilizada em aplicações biotecnológicas, indústria de bebidas e nutrição animal (Lynd *et al.*, 2002; Castro e Pereira Jr, 2010), para hidrólise de matérias celulósicos no sedimento; 3) e adição de um poderoso agente oxidante chamado de ninidrina, usado na detecção de aminoácidos (Plummer, 1978) , anteriormente utilizado por Bell para coloração de ovos de *S. mansoni* (Bell, 1963).

HISTÓRICO DO CAPÍTULO I: Os dados de coloração de ovos utilizando ninidrina foram obtidos durante Mestrado realizado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS. A experimentação com detergente, enzima celulase e padronização da nova metodologia foi realizada durante o primeiro ano de doutorado no

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Estes dados foram publicados na revista *Experimental Parasitology*, em artigo intitulado “Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis” (encontrado neste capítulo na página 42). Neste artigo, foram propostos seis critérios de identificação para ovos de *S. mansoni* quando corados com ninidrina, posteriormente revisados e analisados a partir do material produzido no inquérito, realizado no sul de Sergipe, em novembro de 2015. Estas análises, e a consolidação da proposta dos critérios, fazem parte de um *short communication* recentemente submetido ao periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, intitulado “Criteria for identification of *Schistosoma mansoni* eggs from Helmintex fecal sediments stained with ninhydrin” (encontrado neste capítulo na página 49).

Esta nova versão do método Helmintex foi aplicada em dois ensaios de campo que hoje se encontram publicados na revista *PLoS Neglected Tropical Diseases* em dois artigos, intitulados respectivamente “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” e “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”, encontrados nesta Tese no ANEXO E e F. Estes dois estudos demonstraram a maior sensibilidade do Helmintex em relação aos métodos de Kato-Katz e o POC-CCA.

Por este motivo, o Helmintex[®] foi escolhido como método de referência na comparação entre os métodos Kato-Katz e POC-CCA, no projeto de pesquisa multicêntrico denominado, “Validação de Teste Diagnóstico de Urina POC-CCA (Antígeno Catódico Circulante) para detecção de esquistossomose em áreas de baixa endemicidade”, coordenado por Otávio Sarmiento Pieri (LEAS/IOC-Fiocruz). Tal projeto foi encomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, para produzir dados que suportassem a decisão de rever, no país a rotina de varredura de casos e determinação das taxas de prevalência. Grupos participantes deste projeto: das unidades da FIOCRUZ do Rio de Janeiro, Minas Gerais e da Bahia, bem como da Universidade Federal do Ceará e do Instituto Evandro Chagas, do Pará, passaram por treinamento da metodologia Helmintex, em curso ministrado no mês de setembro de 2018, pela autora desta Tese (ANEXO H).

2. OBJETIVO GERAL

Aperfeiçoar o método Helmintex[®] para reduzir o tempo de processamento de amostras e aumentar a eficácia do processo de detecção.

2.1. Objetivos específicos

- Reduzir o volume do sedimento final do Helmintex[®], através da incorporação de um detergente não iônico (Tween-20) e incubação com celulase;
- Aperfeiçoar e padronizar o método de coloração dos ovos de *S. mansoni* com ninidrina no sedimento final do Helmintex[®];
- Revisar os critérios de identificação de ovos de *S. mansoni*, corados pela ninidrina.

3. ARTIGO I

Experimental Parasitology 177 (2017) 28–34



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Full length article

Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis



Vivian Favero ^{a,b}, Renata Russo Frasca Candido ^{a,c,d}, Carolina De Marco Verissimo ^{a,c},
 Malcolm K. Jones ^c, Timothy G. St. Pierre ^d, Catieli Gobetti Lindholz ^a,
 Vinicius Duval Da Silva ^b, Alessandra Loureiro Morassutti ^{a,*}, Carlos Graeff-Teixeira ^a

^a Laboratório de Biologia Parasitária, Faculdade de Biociências e Laboratório de Parasitologia Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

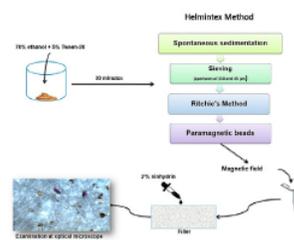
^c School of Veterinary Sciences, The University of Queensland, Queensland, Australia

^d School of Physics, The University of Western Australia, Crawley, Western Australia, Australia

HIGHLIGHTS

- Modifications performed in the Helmintex method significantly decreased the time for completing examination.
- The treatment of fecal debris with Tween-20 significantly reduced the final sediment produced by the Helmintex method.
- Incubation with Tween 20, removal of the 75 μm aperture sieve and staining with ninhydrin resulted in improved egg recovery.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 13 September 2016
 Received in revised form
 30 March 2017
 Accepted 18 April 2017
 Available online 19 April 2017

Keywords:
 Diagnosis
 Helmintex
 Ninhydrin
Schistosoma mansoni
 Low endemic area

ABSTRACT

A diagnostic test that is reliable, sensitive, and applicable in the field is extremely important in epidemiological surveys, during medical treatment for schistosomiasis, and for the control and elimination of schistosomiasis. The Helmintex (HTX) method is based on the use of magnetic beads to trap eggs in a magnetic field. This technique is highly sensitive, but the screening of fecal samples consumes lots of time, thus delaying the results, especially in field studies. The objective of this work was to determine the effects of incorporation of the detergent Tween-20 into the method in an attempt to decrease the final pellet volume produced by the HTX method as well as the use of ninhydrin to stain the *Schistosoma mansoni* eggs. We showed that these modifications reduced the final volume of the fecal sediment produced in the last step of the HTX method by up to 69% and decreased the screening time to an average of 10.1 min per sample. The use of Tween 20 and ninhydrin led to a high percentage of egg recovery (27.2%). The data obtained herein demonstrate that the addition of detergent and the use of ninhydrin to the HTX process can optimize the screening step and also improve egg recovery, thus justifying the insertion of these steps into the HTX method.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis mansoni is a parasitic disease that is becoming more prevalent, despite the advances and efforts to control its spread (Chitsulo et al., 2000). A definitive diagnosis of this disease is based on the identification of the parasite eggs in the feces of

* Corresponding author. Av Ipiranga 6690, Porto Alegre 90690-900, RS, Brazil.
 E-mail address: almorassutti@gmail.com (A.L. Morassutti).

infected individuals (Albonico et al., 2012; Levecke et al., 2014). However, most methods currently used in schistosomiasis diagnosis do not show sufficient sensitivity in areas where it has been recently introduced or where actions have been implemented to control the disease, leading to a decrease in parasite load, thus resulting in a lower number of eggs in the feces (Corachan, 2002; Noya et al., 2002).

The World Health Organization (WHO) recommends using the Kato-Katz (KK) method for schistosomiasis diagnosis (Katz et al., 1972) in field studies as it is a simple and low-cost technique. The KK method has a specificity of 100%, but its sensitivity varies with the prevalence and intensity of infection (Gray et al., 2011). According to a study conducted by Enk et al. (2008), a single sample examined by the KK method is not sufficient for the diagnosis of positive cases of schistosomiasis in low endemic areas.

A significant advance in the diagnosis of schistosomiasis in low endemic areas was the development of the Helmintex (HTX) method, which promotes the isolation of *S. mansoni* eggs based on their interaction with paramagnetic particles in a magnetic field (Teixeira et al., 2007). This technique has 100% sensitivity for egg burdens above 1.3 eggs per gram of feces (Teixeira et al., 2007), which is greater than the method currently recommended by the WHO (Caldeira et al., 2012; Pinheiro et al., 2012). Nonetheless, the HTX method requires several steps that culminate in a final sediment to be analyzed through the reading of an average of 21 slides. Due to the time required to complete the whole analysis, the method is not feasible for large-scale use or field studies.

The aims of this study were to develop a modified HTX method that includes two new steps, in order to make it more efficient and less time consuming, and to compare it to the standard HTX method. Therefore, we tested the incorporation of a nonionic detergent, Tween-20 (Helenius et al., 1979); incubation with cellulase enzyme, which is capable of hydrolyzing cellulosic materials (Lynd et al., 2002; Tolan, 2002); and the use of ninhydrin staining of the final sediment, in order to stain the *S. mansoni* eggs (Bell, 1963).

2. Material and methods

2.1. Biological material

Schistosoma mansoni eggs were obtained from infected mouse livers used for the maintenance of the parasite cycle in the Parasitic Biology Laboratory of the School of Biosciences, PUCRS (Ethics clearance, CEUA- 15/00443).

Human feces samples, hookworm eggs, and *Ascaris lumbricoides* eggs were obtained from a survey in the municipality of Januária, Minas Gerais, Brazil, in association with the Institute of Biological Sciences (UFMG) (MCTI, CNPq, MS-SCTIE, - Decit No. 40/2012).

Fasciola hepatica eggs were obtained from sanitary inspections of slaughterhouses provided by the Laboratory for Molecular Biology of Cestodes of the Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The worms were crushed and mixed with 0.9% saline solution, filtered through sieves with apertures of 150, 75, and 45 μm , and the eggs retained in the 45- μm sieve were stored in 0.9% saline solution at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

All the stool and egg samples obtained for this study were separated in different aliquots, fixed, and maintained in 0.9% saline solution at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10% formaldehyde, 70% ethanol, or 100% ethyl acetate, according to each protocol used.

2.2. Standard Helmintex method

The standard HTX procedure was performed as described by Teixeira et al. (2007). Briefly, 30 g of feces were fixed in 10%

formaldehyde and filtered through a sieve with an aperture of 500 μm . After consecutive washes and sedimentation, the pellet was passed through three different sieves (apertures of 150, 75, and 45 μm). The material retained on the last sieve (45 μm) was processed by the Ritchie method (1948), and 19 μL of paramagnetic particles (Bangs Labs, USA) was added to the final sediment. After incubation for 30 min, the microtubes containing the final sediment were placed in contact with a rare earth magnet (Bangs Labs, USA), and the material that did not adhere to the wall of the microtube was discarded. The samples were placed on slides, covered with a coverslip, and examined by compound optical microscopy using a 10 \times magnification objective lens. The entire coverslipped area was examined.

2.3. Modified HTX method

The following modifications were made to the standard HTX method and compared against the standard method described above.

Modification 1: a) Sample fixation with 70% ethanol; b) use of filter paper as a support for staining of the final pellet with 3% ninhydrin for 15 min at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Modification 2: a) Sample fixation with 70% ethanol and treatment with detergent (0.5%, 2.5%, or 5% Tween-20; T-0.5, T-2.5, and T-5, respectively); b) elimination of the 75- μm sieve.

Modification 3: a) Sample fixation with 70% ethanol and treatment with detergent (T-5); b) elimination of the 75- μm sieve; c) use of filter paper as a support for staining of the final pellet with 3% ninhydrin for 15 min at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Modification 4: a) Sample fixation with 70% ethanol; b) elimination of the 75- μm sieve; c) sample treatment with 5 mg/mL cellulase (C-5) to reduce the sediment volume obtained in the 45- μm sieve; d) use of filter paper as a support for staining of the final pellet with 3% ninhydrin for 15 min at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Ninhydrin staining of eggs

For staining of the final sediment, three different concentrations of ninhydrin solution (Sigma-Aldrich) were tested: 1%, 2%, and 3% ninhydrin in 70% ethanol. For each concentration, three groups of 20 *S. mansoni* eggs in 10% formaldehyde and three groups of 20 *S. mansoni* eggs in 0.9% saline solution were placed on filter paper, covered with 500 μL of each ninhydrin solution, respectively, and incubated at $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 min. The eggs that had purple coloration were counted. The experiments were performed in duplicate.

From the observation that the eggs fixed with 10% formaldehyde were not stained by ninhydrin, other methods were tested. Groups of 100 *S. mansoni* eggs were seeded in stool samples, which were then fixed with 70% ethanol or 100% ethyl acetate and kept in 0.9% saline (control). The samples were processed by the standard HTX method and stained with the three ninhydrin concentrations as described above. The experiments were performed in triplicate.

Considering that the best results were obtained after the fixation of samples with 70% ethanol and 3% ninhydrin, two groups of 20 *S. mansoni* eggs fixed with 70% ethanol were processed according to modification 1 of the HTX method to the final sediment. The samples were then placed onto qualitative filter paper (5 cm \times 2.5 cm; UNIFIL 24- μm pore, Brazil) and stained with 3% ninhydrin. The filter papers were placed on glass slides, moistened with 70% ethanol, and examined by light microscopy (10 \times magnification). The eggs were counted and checked for staining. The experiments were performed in triplicate.

To determine the optimal time and temperature for the staining, eight groups of 20 *S. mansoni* eggs were seeded in 100 μL of the final pellet obtained by modification 1 of the HTX method. The

sediments were stained with 3% ninhydrin and exposed to different temperatures: 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, and 37 °C. The samples were checked every 10 min for 60 min to verify the progress of the staining. The eggs were counted and checked for staining. The experiments were performed in triplicate.

To verify if the use of ninhydrin would result in a more efficient HTX method, two groups containing 10 samples of 30 g of feces and 100 eggs each were tested. The first group was processed according to the standard HTX method, and the second group was processed according to modification 1 of the standard HTX method. The sediments were analyzed using optical microscopy, and the eggs were counted and checked for staining. The time consumed to analyze the sample was also counted.

In order to verify if ninhydrin would stain other helminth eggs, 20 eggs each of *F. hepatica*, *A. lumbricoides*, and hookworm were seeded in the final sediment of the standard HTX method. The samples were stained with 3% ninhydrin, and the staining intensity was observed.

2.5. Tween 20 detergent treatment of the final fecal sediment

In order to evaluate the effect of treating the final sediment obtained from the HTX method with detergent, Tween 20 was tested at different concentrations: 0.5% (T-0.5), 2.5% (T-2.5), and 5% (T-5) in 70% ethanol. The Tween 20 samples were added to samples of 30 g of feces in a sufficient volume to cover the whole fecal sample. After incubation for 30 min, the sample was processed by modification 2 of the standard HTX method (Section 2.3 above), and the final volume was measured.

After opting for the concentration that showed a better volume reduction of the final sediment, two groups with 15 samples containing 30 g of feces each were used. Group I was processed according to the standard HTX method, and group II was fixed with T-5 and processed by modification 2 of the standard HTX method. The final sediment volume was measured for each sample.

2.6. Comparison between the standard HTX method and modification 3

In order to verify if the use of T-5 solution and ninhydrin optimizes the performance of the HTX method without reducing its sensitivity, ten sets of 100 *S. mansoni* eggs were seeded in ten samples of 30 g of feces, and the samples were processed according to modification 3 of the standard HTX method. Next, the filter papers were analyzed by optical microscopy. The numbers of generated filters as well as recovered *S. mansoni* eggs were counted and checked regarding coloration. The time spent screening the samples was also counted.

2.7. The use of cellulase to decrease the final sediment volume

The use of the enzyme cellulase (*Aspergillus niger* 9012-54-8 EEC No. 232734–4, Sigma-Aldrich, USA) was tested at three different concentrations, diluted in sodium citrate buffer (10 mM, pH 4.8; Dynamic-Brazil): 0.25 mg/mL (C-0.25), 1.2 mg/mL (C-1.2), and 5 mg/mL (C-5).

To test the effect of the enzyme, three samples of the sediment retained in the 45- μ m sieve were separated and transferred to 15-mL tubes. C-0.25, C-1.2, and C-5 were added in a sufficient volume to cover the pellet. The tubes were incubated at 37 °C for 2 h. Then, the pellet was again passed through a 45- μ m sieve and processed according to the last steps of the standard HTX method. The final volume of the sediment was measured and recorded.

After defining which cellulase concentration led to a greater reduction of the final sediment volume, two groups of 15 samples

containing 30 g of feces were separated. Group I was processed according to the standard HTX method. Group II was processed without the 75- μ m sieve and the addition of the C-5 cellulase solution to the pellet retained on the 45- μ m sieve. The sediment was incubated at 37 °C for 2 h. The pellet was then treated as described previously. The final volume of the sediment was measured.

2.8. Comparison between the standard HTX method and modification 4

In order to analyze the recovery of the eggs in the final sediment after treatment with the C-5 solution, 100 *S. mansoni* eggs were seeded in ten samples of 30 g of feces. The samples were processed according to modification 4 of the standard HTX method. The number of generated filters was noted; in addition, the recovered *S. mansoni* eggs were counted and checked regarding coloration. The time consumed to screen the samples was counted.

2.9. Identification criteria for *S. mansoni* eggs in the preparation stained with ninhydrin

Fig. 1 illustrates the findings used as criteria for identification of *S. mansoni* eggs in preparations stained with ninhydrin: (a) size (approximately 150 μ m); (b) shape; (c) lateral spicule; (d) sharp delimitation of the shell; (e) purple/blue color (ninhydrin staining); and (f) empty space between the shell and internal content (the miracidium). Size, lateral spicule, and shell delimitation should be considered “major” criteria. At least two major criteria and one minor criterion (color, shape, or empty space) are required to establish diagnosis, but extensive evaluation should be performed to validate the proposed “major” and “minor” classification criteria.

2.10. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for comparison between the standard HTX groups and the different HTX modification methods ($p \leq 0.05$), while the paired Student's t-test was used for comparison between the standard HTX method and those that used Tween-20 or cellulase.

3. Results

3.1. The efficiency of *S. mansoni* egg staining using ninhydrin varied according to the fixative agent and the temperature

The eggs were colored purple when ninhydrin was used at all three concentrations (1%, 2%, and 3%) at 21 °C, although variations in the staining time occurred (Table 1). In eggs treated with 3% ninhydrin, the purple coloration could be observed after 27 min (Fig. 1). The samples did not stain when 10% formaldehyde was used.

The time required to stain the eggs with 3% ninhydrin decreased as the temperature increased. At 37 °C, the eggs became colored at 10 min. However, at 24 °C, purple coloration was achieved at 15 min. Therefore, since 24 °C is similar to room temperature, it was chosen as the temperature for further experiments.

F. hepatica and hookworm eggs also were stained with 3% ninhydrin.

3.2. Staining of the final pellet with ninhydrin and standard HTX processing led to a reduction in reading times but a decreased egg recovery

The samples produced by the standard HTX method presented a

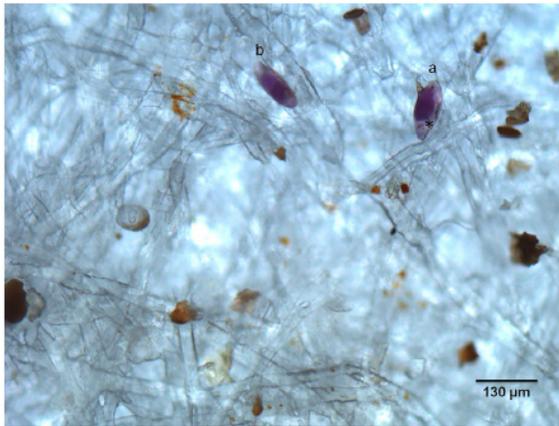


Fig. 1. *S. mansoni* eggs in human fecal sediment stained with 3% ninhydrin (100 × magnification), illustrating the identification criteria: size, purple color, shape, spine, well-defined wall (arrow head), and the internal empty space (asterisk). One egg (a) presents all criteria, while the image of another egg (b) lacks the typical shape and a visible spine. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

recovery of 20% of the total eggs seeded in the initial stool sample when the entire sample was examined. An average of 20 slides were prepared and examined in 6 h and 26 min. Modification 1 of the HTX method, which was carried out with the addition of ninhydrin to the final sediment, presented a total of 13.2% of eggs stained in the entire sample, and 4 filters were prepared and examined in 23 min (Figs. 2–4).

3.3. The use of tween 20 detergent in the fixation step led to a reduction in the final sediment volume produced by the HTX method

Modification 2 of the HTX method led to a reduction of $13 \pm 6\%$ ($p = 0.011$) of the final sediment volume with T-0.5, $38 \pm 3\%$ ($p < 0.0001$) with T-2.5, and $54 \pm 5\%$ ($p < 0.0001$) with T-5, compared with the final sediment volume of the standard HTX method.

The use of T-5 solution in 15 samples led to a significant ($p < 0.0001$) reduction in the final sediment volume with the modified method, with a mean volume reduction of 69% compared to the standard method (Fig. 5).

Table 1
Mean time used to stain *S. mansoni* eggs with ninhydrin.

Ninhydrin solution	Ninhydrin	Coloration	Average time for staining (min)
Formaldehyde 10%	1%	–	–
	2%	–	–
	3%	–	–
Saline 0.9%	1%	+	51
	2%	+	43
	3%	+	27
Ethanol 70%	1%	+	52
	2%	+	40
	3%	+	24
Ethyl acetate 100%	1%	+	54
	2%	+	37
	3%	+	29

Results represent the average of three triplicate: negative staining (–); positive staining (+).

3.4. The use of cellulase led to a reduction in the final sediment volume produced by the HTX method

The addition of cellulase to the sediment retained in the 45- μm sieve showed a volume reduction of 14.7% with the use C-0.25, 27.9% with C-1.2, and 41.7% with C-5, when compared to the final sediment volume produced by the standard HTX method.

The addition of C-5 to 15 samples led to a significant ($p < 0.0001$) reduction in the final sediment volume with the modified method, with a mean volume reduction of 48% compared to the standard method (Fig. 6).

3.5. Detergent addition and ninhydrin staining improved the performance of the HTX method

With the addition of the detergent Tween 20 and ninhydrin to the stool samples containing *S. mansoni* eggs, a 27.2% recovery of the seeded eggs was obtained. The final sediment was examined in 10 min by screening an average of 2.6 filter papers per sample (Figs. 2–4).

3.6. Cellulase treatment of the HTX final sediment decreased the recovery of *S. mansoni* eggs

The use of cellulase showed a recovery of 11.2% of the eggs, while the standard HTX method showed a recovery of 20%. The average number of filter papers used to screen the samples was 3.3, and an average of 12 min was needed to analyze each sample (Figs. 2–4).

4. Discussion

It is well known that efforts to control schistosomiasis are hindered by the lack of sensitive diagnostic tools (Sandoval et al., 2006; Spear et al., 2012). The control of this parasite relies on mass drug administration in endemic areas in an attempt to alleviate morbidity of individuals affected by this disease (Geary, 2012). However, effective therapy has the potential to turn those areas into low endemic areas, where the infected population will present a low worm burden when examined, making detection of the

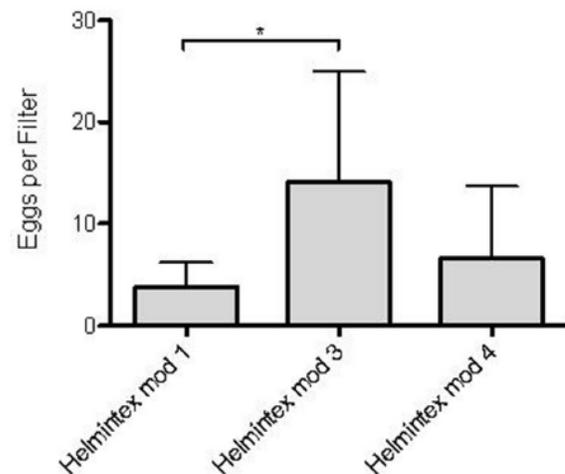


Fig. 2. Mean number of eggs per filter paper together with standard deviations shown as error bars for each modified Helminthex method. * indicates a significant difference ($p < 0.05$).

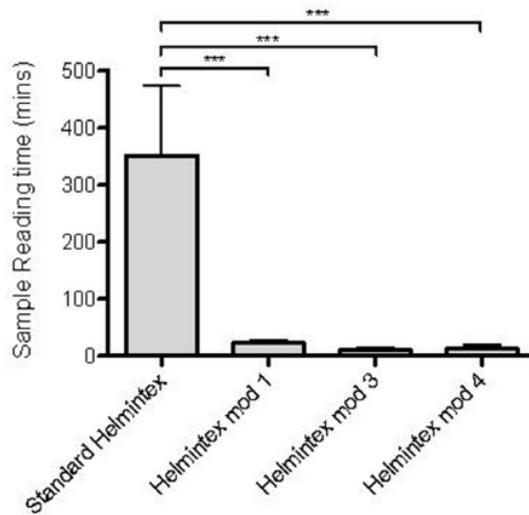


Fig. 3. Mean time required to read a sample with standard deviations shown as error bars for each modified Helminex method. *** indicates a significant difference ($p < 0.0001$).

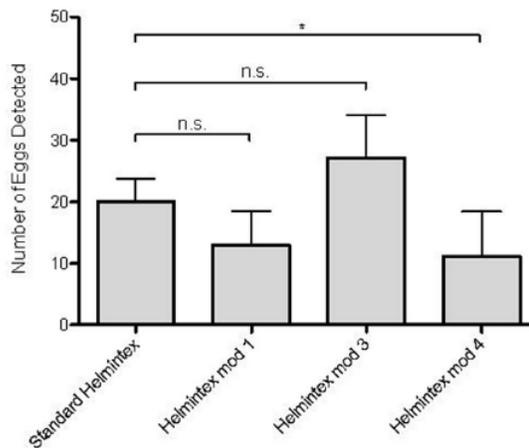


Fig. 4. Means and standard deviations of the total number of eggs detected in 10 samples of seeded feces for each modified Helminex method. ANOVA indicates that the means are significantly different. Tukey's multiple comparison test was used to determine whether the difference is significant from the standard Helminex method; n. s. indicates not a significant difference; * indicates a significant difference ($p < 0.05$).

parasite in those individuals very difficult (Spear et al., 2012). Therefore, a reliable and very sensitive new gold standard technique applicable in field studies is urgently needed.

The WHO recommends the KK method for epidemiological studies, but it lacks sensitivity for lower egg burdens (Ebrahim et al., 1997; Zhanga et al., 2009). In individuals excreting fewer than 100 eggs per gram of feces, the estimated sensitivity is 60% (Alarcón de Noya et al., 1992; Noya et al., 2002).

Recent studies have shown that the sensitivity of the HTX method is superior to that of the KK method (Caldeira et al., 2012; Pinheiro et al., 2012). Data presented by Teixeira et al. (2007) show

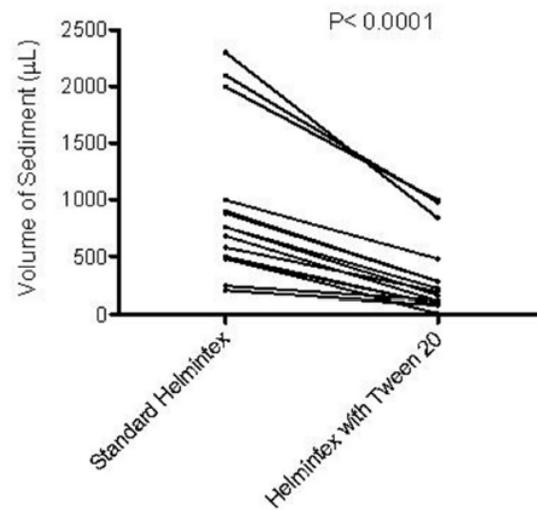


Fig. 5. Sediment volumes at the final step using the standard Helminex method compared to the Helminex method with Tween 20 (modification 2) for 15 samples of seeded feces. The Student's paired *t*-test indicates a significant ($p < 0.0001$) reduction in the final sediment volume with the modified method, with a mean volume reduction of $69 \pm 15\%$ compared to the standard method.

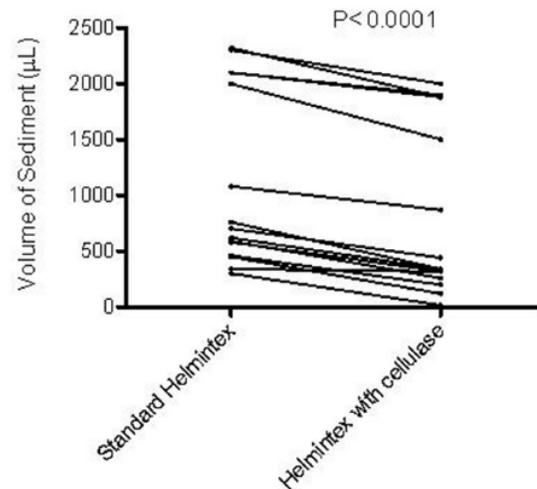


Fig. 6. Sediment volumes at the final step using the standard Helminex method compared to the Helminex method with cellulase (modification 4) for 15 samples of seeded feces. The Student's paired *t*-test indicates a significant ($p < 0.0001$) reduction in the final sediment volume with the modified method, with a mean volume reduction of $48 \pm 26\%$ compared to the standard method.

that the HTX method recovers 30 times more eggs than the KK method. This is a huge improvement in parasitological diagnostics, and the HTX method currently stands as one of most sensitive methods in the validation stage.

Nevertheless, the HTX method presents some disadvantages. For example, it is difficult to perform in field studies because laborious processing is necessary. Another disadvantage is the time required to analyze the numerous slides generated from the last

step of the method.

Taking into consideration these difficulties, the present study aimed to implement solutions that could improve and optimize the performance of the HTX method by reducing the final sediment volume and staining the eggs to facilitate their visualization in the final sediment.

Bell (1963) proposed staining *S. mansoni* eggs with ninhydrin. Ninhydrin is an oxidizing agent that reacts with α -amino acids at a pH between 4 and 8, generating a compound with a purple color (Plummer and Plummer, 1988). However, combining the HTX method and Bell's method would add to the processing time because Bell's original process requires a 12-h incubation with ninhydrin solution (Bell, 1963). In order to reduce this processing time, modifications of the original methods were evaluated. In this study, it was shown that 3% ninhydrin staining of *S. mansoni* eggs is accomplished within 15 min at room temperature. The use of ninhydrin also significantly reduced the time for complete screening of samples by microscopy from an average of 6 h–23 min.

In addition, we evaluated the specificity of ninhydrin staining using eggs from other parasites that have a similar size to those of *S. mansoni*, which would likely be present in the HTX final sediment. The observation that *F. hepatica* and *Ancylostoma* sp. eggs were also stained does not affect the application of ninhydrin in the process as the morphological characteristics are still preserved and *S. mansoni* eggs are easily recognized when compared to other eggs of the same size.

In an attempt to reduce the final sediment volume produced by the HTX method, the addition of cellulase and Tween 20, separately, was tested. In general, the cellulase produced by filamentous fungi presents its best activity under acidic conditions (pH 3.6–5.0) and at high temperatures such as 54 °C (Castro, 2010). In the present study, the incubation with cellulase was done at 37 °C and pH 4.8, leading to a 48% reduction of the final sediment volume. It is possible that incubation of the sediment with the enzyme at higher temperatures could result in an even lower volume. However, the conditions used here were chosen to avoid shrinkage of the miracidium, minimize structural distortions of the eggs, and reduce egg hatching, all of which could ultimately render identification of *S. mansoni* eggs difficult (Bell, 1963).

Tween 20, also known as polyethylene glycol sorbitan monolaurate, is a nonionic detergent that is able to break protein–lipid and lipid–lipid interactions; it is often used as a cleaning agent during enzyme-linked immunosorbent assay procedures (Helenius et al., 1979). When this detergent was applied to the initial steps of the HTX method, a significant reduction in the final sediment volume resulted, producing a volume 69% lower than that of the standard HTX method. These results showed that Tween 20 was more effective than cellulase at reducing the final sediment volume. The sediment produced after the addition of Tween 20 was laid out on an average of 2.6 filter papers per sample, and its examination by microscopy was completed in an average of 10 min.

Sieving steps are sites for retention of eggs, especially if the eggs adhere to clumps of fecal debris. These clumps are usually seen by microscopy of untreated sediments. The removal of the 75- μ m sieve step in combination with the use of Tween-20 (modification 3 of the HTX method) led to the highest egg recovery, compared to either the standard HTX method or other modified methods. This improvement could be due to the fact that some eggs might get trapped in the 75- μ m sieve during the standard HTX procedure.

The data presented in this work will pave the way for further investigations. One consideration to be made could be to double the amount of feces initially used in the method, enabling the HTX method to analyze a larger sample from each patient. In this way, the HTX method could halve the limit of the detection of eggs per gram of feces, thus further improving its sensitivity.

In summary, the modifications of the HTX method evaluated (5% Tween 20, removal of the 75- μ m sieve, and ninhydrin staining) significantly improved the recovery of *S. mansoni* eggs by 27.2% while decreasing the examination time by microscopy. Although the modified HTX method is still a complex and labor-intensive method, its high sensitivity and specificity supports its use as the gold standard for evaluation of other diagnostic tools for schistosomiasis. This modified HTX method may also have a role in field applications, like cure control and as one criterion for transmission interruption certification. Other modifications are also currently being studied.

Acknowledgments

Financial support was provided by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Brasil (CNPq), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) “edital 32/2010”, and FAPERGS. C. Graeff-Teixeira is a recipient of a CNPq PQ 1D fellowship and grants (307005/2014–3). We also thank Dr. Martin Cancela from the Laboratório de Cestódeos UFRGS and Dr. Stefan M. Geiger from the Instituto de Ciências Biológicas UFMG.

References

- Alarcón de Noya, B., Noya, O., Balzán, C., Cesari, L.M., 1992. New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 227–231.
- Albonico, M., Ame, S.M., Vercruyse, J., Levecke, B., 2012. Comparison of the Kato-Katz thick smear and McMaster egg counting techniques for monitoring drug efficacy against soil-transmitted helminths in schoolchildren on Pemba Island, Tanzania. *Tran R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 199–201.
- Bell, D.R., 1963. A new method for counting *S. mansoni* eggs in faeces. *Bull. Org. Mond. Santé Bull. Wld. Hlth. Org.* 29, 525–530.
- Caldeira, C., Teixeira, C.F., Silveira, M.B., Fries, L.C.C., Romanzini, J., Bittencourt, H.R., Graeff-Teixeira, C., 2012. Comparison of Kato-Katz and Helminx methods for the diagnosis of schistosomiasis in low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Paraná, southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 690–692.
- Castro, A.M., 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova* 33, 181–188.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 77, 41–51.
- Corachan, M., 2002. Schistosomiasis and international travel. *Travel Med.* 35, 446–450.
- Ebrahim, A., El-Morshedy, H., Omer, E., El-Daly, S., Barakat, R., 1997. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 706–708.
- Enk, M.J., Lima, A.C., Drummond, S.C., Schall, V.T., Coelho, P.M., 2008. The Effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop.* 108, 222–228.
- Geary, T.G., 2012. Are new anthelmintics needed to eliminate human helminthiasis? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 709–717.
- Gray, D.J., Ross, A.G., Li, Y.S., MacManus, D.P., 2011. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* 342, d2651.
- Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E., Tanford, C., 1979. Properties of detergents. *Methods Enzymol.* 56, 734–749.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 14, 397–400.
- Levecke, B., Brooker, S.J., Knopp, S., Steinmann, P., Sousa-Figueiredo, J.C., Stothard, J.R., Utzinger, J., Vercruyse, J., 2014. Effect of sampling and diagnostic effort on the assessment of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis and drug efficacy: a meta-analysis of six drug efficacy trials and one epidemiological survey. *Parasitol* 141, 1826–1840.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577.
- Noya, O., Alarcón-de-Noya, B., Losada, S., Colmenares, C., Guzmán, C., Lorenzo, M.A., Bermúdez, H., 2002. Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low transmission. A review of a line of research. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 167–169.
- Pinheiro, M.C.C., Carneiro, T.R., Hanemann, A.L.P., Oliveira, S.M., Bezerra, F.S.M., 2012. The combination of three faecal parasitological methods to improve the diagnosis of *Schistosomiasis mansoni* in a low endemic setting in the state of Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 873–876.
- Plummer, M., Plummer, D.J., 1988. *An Introduction to Practical Biochemistry*, 2. ed.

- Tata McGraw Hill Publishing Company.
- Ritchie, L.S., 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull. U. S. Army Med. Dep.* 8, 326.
- Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Lopez Aban, J., Perez-Arellano, J.L., Garate, T., Muro, A., 2006. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Exp. Parasitol.* 114, 84–88.
- Spear, R.C., Seto, E.Y., Carlton, E.J., Liang, S., Remais, J.V., Zhong, B., Qui, D., 2012. The challenge of effective surveillance in moving from low transmission to elimination of schistosomiasis in China. *Int. J. Parasitol.* 41, 1243–1247.
- Teixeira, C.F., Neuhaus, E., Ben, R., Romanzini, J., Graeff-Teixeira, C., 2007. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS NTD* 1, 73.
- Tolan, J.S., 2002. logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean. Techn. Environ. Policy* 3, 339–345.
- Zhang, Y.Y., Luob, J.P., Liuc, Y.M., Wangd, Q.Z., Chene, J.H., Xuf, M.X., 2009. Evaluation of Kato-Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: a Bayesian modeling approach. *Acta Trop.* 112, 16–22.

4. ARTIGO II

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Criteria for identification of *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments prepared with the Helmintex method and stained with nynhidrin

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Perotto-De-Souza, Renata; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversity Favero, Vivian; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversity Pascoal, Vanessa; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversity Lindholz, Catieli; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversity Pontificia Bittencourt, Helio; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Mathematics, Polytechnical School Graeff-Teixeira, Carlos; Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversity Pontificia
Keyword:	schistosomiasis, egg-detection, nynhidrin, coproparasitology
Theme:	Parasitology, Schistosomiasis, Diagnostics

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

Porto Alegre, november 8th, 2018.

To the Editor

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

I hereby submit the manuscript “Criteria for identification of *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments prepared with the Helmintex method and stained with nynhidrin” as a “short communication” for publication at MIOC.

I stay ready for any information or procedure that is required by the editors/reviewers, as the corresponding author.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Graeff-Teixeira', enclosed in a rectangular box.

Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Laboratory of Parasite Biology

School of Sciences, PUCRS

Celular 51 99981 8599

graeff.teixeria@gmail.com

Short Communication

Running Title: Schistosome eggs stained by nynhidrin

Criteria for identification of *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments prepared with the Helmintex method and stained by nynhidrin

Renata Perotto de Souza¹, Vivian Favero¹, Vanessa Fey Paschoal¹, Catieli Lindholz¹, Hélio Radke Bittencourt², Carlos Graeff-Teixeira^{1#}

¹School of Sciences and ²Polytechnical School, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS)

corresponding author: graeff.teixeira@gmail.com

Sponsorship: CG-T is a recipient of a CNPq PQ 1D fellowship and grants 307005/2014-3. RP-S is a recipient of a BPA-PUCRS fellowship.

ABSTRACT

Helmintex is a sensitive method for detecting *Schistosoma mansoni* (Sm) eggs. Here, we describe the individual frequency of six proposed criteria for the identification of Sm eggs prepared with the Helmintex method and stained with nynhidrin. The capacity for these criteria to classify *Sm* eggs when applied in various combinations is also examined. Nine observers registered the presence or absence of six different criteria in 100 eggs at microscopy (100x). The nynhidrin purple color was frequently observed and was the criteria associated with the lowest inter-observer variability. Use of at least three criteria also resulted in a significantly better performance in the identification of eggs.

Key words: schistosomiasis – egg-detection – nynhidrin - coproparasitology

An increasing number of countries have achieved control of schistosomiasis with the goal of eliminating this public health problem, or at the very least, interrupting its transmission (Tchuenté et al., 2017; Zoni et al., 2016; WHO, 2013). However, classical diagnostic methods lack the sensitivity needed to diagnose schistosomiasis in areas with reduced infection intensity (De Vlas and Gryssels, 1992; Kittur et al., 2016). A recent development in the ability to diagnose schistosomiasis has been use of the Helmintex (HTX) method (Teixeira et al., 2007). This method uses the interaction of eggs with paramagnetic particles in a magnetic field to obtain a sample that can then be stained with ninyhydrin (Bell, 1963). However, despite the high sensitivity of this method, it is a laborious method despite several modifications (e.g., new sieving procedures, inclusion of detergent in the fixation solution, and staining of eggs with ninyhydrin for examination at a microscope) (Favero et al., 2017). While the HTX method is not a “point-of-care” diagnostic method, it is considered to be a reference method for detecting schistosomiasis due to its extremely high sensitivity (Lindholz et al., 2018).

Favero et al. (2017) have proposed a set of criteria for the identification of *Schistosoma mansoni* (*Sm*) eggs in preparations obtained via the HTX method and stained with ninyhydrin. These criteria include: 1) the presence of spines; 2) egg size: 150-117µm x 70-40µm (Lenzi et al., 2008); 3) egg shape; 4) definition of shell line; 5) internal space; and 6) color. The goal of this study was to evaluate these criteria by: (i) describing the frequency of individual and combinatorial subsets of these six criteria and (ii) evaluating the performance of the criteria for identifying *Sm* eggs.

Filter papers containing positive fecal sediments were originally prepared as part of a field study conducted in Candeal, Sergipe in northeastern Brazil. The original study was approved by the PUCRS ethical committee (register 48809715.1.0000.5336) and the field and laboratory protocols used are described elsewhere (Lindholz et al., 2018). We selected these filter papers for reexamination in the present study.

The criteria for identifying *Sm* eggs in HTX preparations stained with ninyhydrin were proposed by experienced readers at the GPB-PUCRS laboratory. These criteria were paired according to their presumed contribution to a definitive diagnosis of *Sm* eggs, with slightly decreasing certainty associated with Groups A–C, respectively (Figure 1). Different combinations of criteria from Groups A, B, and C were also

analyzed in the following subsets: Combination 1 - defined as the use of criteria from only one Group; Combination 2 - defined as the use of criteria from any two Groups; and Combination 3 - defined as having at least one criteria from all three Groups.

Analysis was performed by a group of nine readers who simultaneously observed selected fields containing a total of 100 eggs on a flat screen monitor. The readers recorded their observations regarding the six possible criteria on a standardized form. All of the images shown were obtained with a ZEISS AXIO microscope equipped with a QIMAGE RESTINGA 7 camera and IMAGE PRO 7 software. The projected images were obtained at 100 x magnification. Graphs were generated and statistical analysis were performed with IBM SPSS 20. Frequencies and Confidence Intervals (CI) for proportions were computed to compare the prevalence among the criteria.

The proportional frequencies of the criteria observed ranged from 58 % (shape) to 99 % (purple color). The criteria, “shape” and “definition of shell line”, had the highest inter-observer variability with CI 95%, from 54.9% to 61.3% (range: 6.4) and 70.2% to 76% (range: 5.8) respectively. The best performance and highest inter-observer agreement were associated with Combination 3 (observing at least one criteria from each Group) (Figure 2).

The classification of criteria into Groups A, B, and C was based on their decreasing specificity for identifying helminth eggs and *Sm* eggs (Figure 1). The presence of a lateral spine is a very unique characteristic of *Sm* eggs, and use of this criterion for detecting *Sm* eggs was nearly 100% specific. The criteria, “definition of shell line”, refers to an often well-defined line that is a very striking feature of many helminth eggs (e.g., *Ancylostoma* spp eggs and *Enterobius* spp eggs). However, the possibility that fecal sediment debris will present these features is very low. If the eggs are not deformed, they may present appropriate size and/or shape for identification (e.g., Group B criteria).

The purple color produced by nynhidrin staining (Group C criteria) is very helpful for quickly spotting eggs during an initial screening of filters under the microscope. However, other debris may also stain purple. While the purple color criteria had the highest detection prevalence (99.7%) and the lowest inter-observer variability (range: 0.7), the use of this criteria alone (or any of the other criteria alone) was not sufficient for

egg identification. Moreover, a clear space between the miracidium and the eggshell (Group C criteria) is not always present and it is not specific for *Sm* eggs. Therefore, except for the presence of a lateral spine and purple coloring, correct identification of the other four criteria requires more extensive observer training.

In areas with high prevalence and intensities of infection, recognition of egg details under a microscope have not been a serious concern. However, with an increasing number of low endemic areas, more careful training and microscopic examinations are required, particularly when detection of eggs by microscopy is required for a reference method or cure control. The inter-observer variability can be improved with continuous and rigorous training of observers and quality control measures. However, it was quite clear that Combination 3 (observation of at least one criteria from each Group) had the best performance compared to Combinations 1 and 2, being all combinations mutually different at 0.05 significance level (Figure 2).

In conclusion, the present findings indicate that identification of *Sm* eggs can be achieved with nymhidrin-stained HTX preparations when at least one criterion from each Group (A–C) was detected. Our findings also indicate that classification of preparations, as “major/minor” is not recommended. The proposed use of combinatorial observations for identifying *Sm* eggs was found to be especially useful for egg specimens prepared according to the highly sensitive HTX method. Thus, the high sensitivity of the HTX method combined with the use of multiple criteria for the egg identification should provide more reliable diagnosis in settings characterized by extremely low infection intensities.

REFERENCES

- De Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today*. 1992;8(8):274-7.
- Bell DR. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces. With special reference to therapeutic trials. *Bull World Health Org*, 1963; 29: 525-30.
- Favero, V, Candido RF, Verissimo CM, Jones M, Saint-Pierre T, Lindholz CG, et al. Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. *Experimental Parasitology*. 2017;177:28-34 doi:10.1016/j.exppara.2017.04.001.
- Kittur N, Castleman JD, Campbell Jr. CH, 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):605-10.
- Lenzi HL, Juberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In.: *Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Ed Fiocruz, Rio de Janeiro, 2008. Cap 3. P. 119.
- Lindholz CG, Favero V, Verissimo CM, Candido RRF, Souza RP, 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. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006274>.
- Tchuenté LAT, Rollinson D, Stothard JR, Molyneux D. 2017. Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. *Infect Dis Poverty* 6:42-56. DOI 10.1186/s40249-017-0256-8
- 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.
- 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. doi.org/10.1371/journal.pntd.0004493.

WHO. Schistosomiasis Progress Report 2001-2011 and Strategic Plan 2012-2020.

2013. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78074>.

Figure Legends

Figure 1: Overview of the six observation criteria used in this study (divided into Groups A-C) for the identification of *Sm* eggs in sediments prepared according to the HTX method and stained with nynhidrin.

Figure 2: Frequency (95% confidence intervals) of Combinations (Combi) 1, 2, and 3 criteria by nine observers, with mutually significant difference ($p=0.05$).

Group A:

A1: presence of a lateral spine
A2: well-defined shell outline

Group B:

B1: ovoid shape
B2: size 150-117 μm x 70-40 μm

Group C:

C1: space between the shell
and the miracidium
C2: purple color

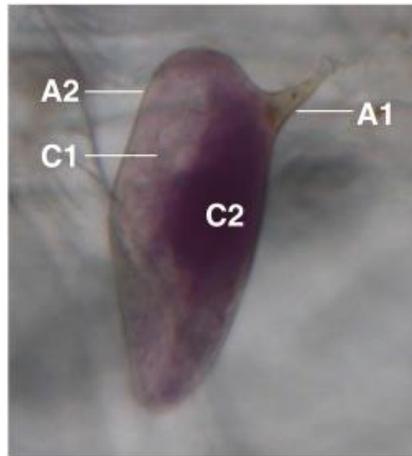


Figure 1 - Overview of the six observation criteria used in this study (divided into Groups A-C) for the identification of Sm eggs in sediments prepared according to the HTX method and stained with nynhidrin.

89x49mm (300 x 300 DPI)

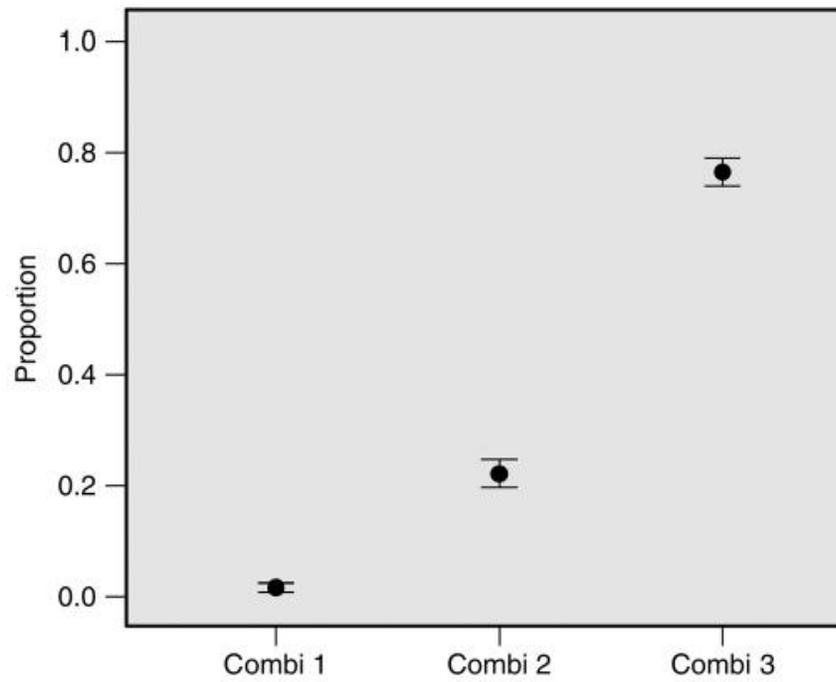


Figure 2: Frequency (95% confidence intervals) of Combinations (Combi) 1, 2, and 3 criteria by nine observers, with mutually significant difference ($p=0.05$).

89x73mm (300 x 300 DPI)

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A alta sensibilidade do método Helmintex[®] está relacionada diretamente com a grande quantidade de fezes utilizadas, aos passos graduais de concentração e a utilização de partículas paramagnéticas, o que tornam o método laborioso e demorado. Os objetivos de aperfeiçoamento do método Helmintex[®], propostos neste Capítulo, não pretendiam modificar nenhuma das etapas que tornam o método tão sensível, mas sim adaptar novas alternativas à metodologia. A utilização de detergente Tween-20 nas 30 gramas de sedimento inicial, resultou na redução do sedimento final Helmintex[®] em até 69%, mesmo após a retirada da peneira com abertura de 75 µm, que poderia estar retendo ovos, já que estes medem aproximadamente 150 µm de comprimento. Este fato poderia justificar a melhora na recuperação de ovos (27,2%), quando comparada a metodologia padrão (≅13%). O uso da ninidrina para corar ovos de *S. mansoni* foi inicialmente descrito por Bell (1963), e a utilização de filtro para deposição do sedimento e posterior leitura, diminuiu em mais de 6 horas o tempo de triagem dos ovos em meio ao sedimento, já que os ovos ficam marcados com cor púrpura, e são mais facilmente detectados. Tais modificações trouxeram ao método uma nova versão e aumentou o potencial de uso do método em campo (Favero *et al.*, 2017). Os resultados dos dois inquéritos, em Januária/MG e em Estância/SE, confirmaram a alta sensibilidade do Helmintex, quando comparado aos métodos Kato-Katz e o POC-CCA (Lindholz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

A utilização da ninidrina para coloração de ovos de *S. mansoni* e a experiência em estudos populacionais com predomínio de baixa carga, expuseram o problema da correta identificação de ovos. Critérios que identificassem um ovo de *S. mansoni* até então não tinham sido propostos e analisados detalhadamente, já que a identificação sempre se baseou em preparações com grande número de ovos e, de forma não sistemática, em alguns dos elementos característicos do ovo, especialmente a forma e a presença do espículo. Assim, é inédita a sistematização de seis critérios em preparações coradas pela ninidrina: 1) espículo, 2) tamanho aproximado, 3) forma, 4) linha bem definida dos limites da casca, 5) espaço entre o miracídio e a casca, 6) coloração púrpura do miracídio.

Portanto, no conjunto tais adequações trouxeram ao método uma redução de sedimento final em até 69%, diminuição do tempo de leitura para em média de 10 minutos por amostra, recuperação de ovos de 27,2%, definição de seis critérios de identificação para ovos de *S. mansoni*.

CAPÍTULO II

Uma nova estratégia diagnóstica utilizando o sistema Luminol-H₂O₂ na detecção de ovos de *Schistosoma mansoni* em sedimento produzido pelo método Helmintex.

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, fenômenos de emissão de luz são descritos, mas, por muito tempo, eram associados a mitos ou fantasmas (Rossi & Ferreira, 2002). Em 1669, a produção de fósforo (pela destilação de ureia), que oxidado pelo ar produz quimiluminescência, levou o médico H. Brandt a realizar o primeiro relato sobre o fenômeno (Campbell e Campbell, 1988). O primeiro composto orgânico sintético quimiluminescente, descrito em 1887, foi a lofina (2,4,5-trifenilimidazol) (Radziszewski, 1877). A partir desses resultados, em 1888 Wiedemann diferenciou quimiluminescência de incandescência, definindo-a como “emissão de luz que ocorre como parte de processos químicos” (Wiedemann, 1888). O trabalho pioneiro sobre a reação do luminol foi publicado em 1928 por Albrecht, que define quimiluminescência como uma emissão de luz (ultravioleta, visível ou infravermelho) que ocorre durante o processo de uma reação química (Francis *et al.*, 2004). Desde então, a quimiluminescência tem sido objeto de inúmeros estudos.

Todas as reações de quimiluminescência envolvem processos de oxirredução, que ocorrem em compostos orgânicos e inorgânicos, nas fases líquida ou sólida (Isacsson e Wettermark, 1976). Nas últimas décadas, este tipo de fenômeno tem sido amplamente aplicado em áreas científicas e tecnológicas, especialmente em análises clínicas, por apresentar versatilidade e capacidade de limites de detecção ultrasensíveis (Kricka, 2003).

Particularmente, técnicas que utilizam a oxidação do luminol têm sido alvo de inúmeros estudos, provavelmente por ser o mais conhecido dos compostos quimiluminescentes e o mais eficiente (White *et al.*, 1970), além de ser um composto possível de mensuração e visualização pela emissão de luz no espectro visível, de cor azulada. (Ferreira e Rossi, 2002). Atualmente, métodos baseados na detecção da reação do luminol são aplicados para identificação e quantificação de compostos em amostras biológicas, como tecidos, urina e sangue (Ci *et al.*, 1993; Kubo e Toriba, 1997).

Vários compostos são descritos como agentes emissores de luz, quando expostos a uma solução de luminol como: peroxidases; compostos com elevada

capacidade de oxidação; compostos que contenham em sua composição química íons férricos ou ferrosos e outros íons metálicos, especialmente cobalto, cobre e manganês, que podem estar presentes moléculas biológicas, incluindo grupos prostéticos ativos em reações redox: proteínas hemínicas, como peroxidases, catalase, citocromos; e biomoléculas não hemínicas, como a enzima com grupamentos ferro-enxofre e as proteínas de transferência de elétrons como a rubredoxina e ferredoxina (Lindley, 1996; Wilson e Schiffrin, 1996). Em particular, quando ocorre à oxidação do luminol por H_2O_2 , os catalisadores envolvidos podem ser: Ferro (III) (Obata *et al.*, 1993) ferrocianeto (Seitz, 1978; Radi *et al.*, 1991); peroxidase de Rábano Silvestre, e outros compostos contendo ferro (Fe) (Radi *et al.*, 1991; Adam *et al.*, 1992; Ci *et al.*, 1993).

O ferro é um dos metais mais abundantes em humanos, e sua maior parte está ligada à hemoglobina ($\cong 66\%$), à mioglobina ($\cong 10\%$), e armazenada nas proteínas ferritina e hemossiderina ($\cong 23\%$) no fígado, baço e medula óssea. Menos de 1% do ferro em humanos está ligado a várias enzimas (proteínas redox) ou está sendo transportado no sangue pela transferrina (Lindley, 1996). Em sua fase adulta, os vermes de esquistossomo habitam os vasos sanguíneos de seus hospedeiros humanos, onde se alimentam de eritrócitos para suprir suas necessidades nutricionais (Whitfield, 1979). O Heme, grupo prostético da hemoglobina consistindo de um íon de ferro (Fe^{2+}), é essencial para o crescimento e reprodução de hemiparasitas como *Leishmania* e *Plasmodium* (Gaughan e Krassner, 1971; Surolia e Padmanaban, 1992), e sua importância na bioquímica do esquistossomo destaca-se devido a grande quantidade de ferriproteínas, tais como citocromo c oxidase e tiorredoxina peroxidase (Cole, 1973; Glanfield *et al.*, 2010). Em 2007, Jones e colaboradores descreveram a existência de altos níveis de ferro (Fe) em fêmeas adultas de *S. mansoni* e seus ovos, indicando que o ferro (Fe) é um elemento necessário para atividade metabólica do verme. Em 2015, experimentos que descrevem a presença heme no corpo de fêmeas de esquistossomos indicaram que este é transportado preferencialmente para os tecidos gonadais (oócito, ovário e células das glândulas vitelinas) para a formação de ovos (Toh *et al.*, 2015). Karl e colaboradores, em 2013, observaram que ovos de *S. mansoni* obtidos de fígado de camundongos contém ferro (Fe) em sua composição. Também foi confirmada a presença nos ovos de enzimas contendo cobre (Cu), como a

tirosinase (Mathieson e Wilson, 2010) DeWalick *et al.*, 2011) em cascas de ovos; dismutase e tioredoxina peroxidase (DeWalick *et al.*, 2011), tioredoxina, superóxido dismutase, peroxidase dependente de ferro (Mathieson e Wilson, 2010) descritas em cascas de ovos e miracídios.

Diante disto, aliadas ao uso de uma de uma ferramenta amplamente utilizada (Khan *et al.*, 2014), o presente estudo objetivou padronizar a utilização do Luminol-H₂O₂ como ferramenta inédita para o diagnóstico de ovos de *S. mansoni* em sedimento fecal, pressupondo a existência de compostos quimiluminescentes, entre eles o íon Fe²⁺, em ovos de *S. mansoni*.

HISTÓRICO DO CAPÍTULO: Nos experimentos iniciais de padronização e prova de conceito do Helmintex[®], quando comparadas várias partículas magnéticas com diferentes ligantes na superfície, notou-se que aquelas contendo estreptavidina tinham melhor desempenho na recuperação de ovos, Tabela 3, em (Teixeira *et al.*, 2007). Isto levou à hipótese da existência de moléculas biotina-símile na superfície dos ovos, e à tentativa bem sucedida de incubar ovos com peroxidase biotinilada, seguindo-se a exposição ao luminol como parte de um kit de revelação de Western-blot, para produção de luz e detecção em filmes de radiologia. Porém, o fenômeno não se reproduzia adequadamente, os controles negativos muitas vezes davam reatividade e nem sempre preparações com ovos resultavam em luz detectável nos filmes. Um dos problemas identificados foi o de lavagem e remoção da peroxidase biotinilada não ligada à estreptavidina. Durante o Mestrado realizado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS, a autora retomou estes experimentos envolvendo o uso da quimiluminescência do sistema Luminol-H₂O₂. Depois de confirmado o ineditismo dos relatos da técnica como método diagnóstico de helmintíases em sedimentos fecais, iniciou-se um processo de pedido de patente junto ao ETT da PUCRS. Após várias reformulações no processo da técnica utilizada e adição da leitura por espectrofotometria, o pedido foi aceito em 2017, e hoje se encontra como pedido de adição de invenção, com o número de processo BR 1020170064786 (ANEXO A). Os dados iniciais foram recentemente submetidos à revista PNAS, em artigo denominado “A new diagnostic strategy which uses a luminol-

H₂O₂ system to detect *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments processed by the Helmintex method” (página 68 deste capítulo). A extensa busca pelo composto responsável pela emissão de luz, neste caso, apresentou inúmeros obstáculos, gerados principalmente pela dificuldade na obtenção de grandes quantidades de ovos vindos de fezes humanas. Resultados parciais, obtidos até o momento (página 95) já nos direcionam aos compostos responsáveis pela quimiluminescência.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a utilidade e o mecanismo de reação de quimiluminescência empregando o sistema luminol-H₂O₂ para a detecção de ovos *Schistosoma mansoni*.

2.1. Objetivos específicos

- Testar a hipótese de que incubação de ovos de *S. mansoni* com luminol-H₂O₂ desencadeie uma reação quimiluminescente com especificidade;
- Investigar variáveis da reação quimiluminescente, quanto à origem dos ovos: fígado de camundongos infectados, cultivo *in vitro* e fezes humanas;
- Verificar se existe correlação entre a intensidade de luz gerada e o número de ovos;
- Padronizar os procedimentos da reação de quimiluminescência, para identificação específica da presença dos ovos;
- Testar a reação de quimiluminescência em amostras de fezes humanas naturalmente infectadas e controles negativos;
- Investigar os componentes e mecanismos responsáveis pela luminescência associada aos ovos;

3. ARTIGO I

Artigo submetido à revista PNAS na data de 07/02/2019

Manuscript #	2019-02255
Current Revision #	0
Submission Date	2019-02-07
Manuscript Title	A new strategy which uses a luminol-H ₂ O ₂ system to detect <i>Schistosoma mansoni</i> eggs in fecal sediments processed by the Helmintex method
Manuscript Type	Direct Submission Plus
Special Features and Colloquia	N/A
Classification	Biological Sciences/Medical Sciences
Database deposition	
Corresponding Author	Vivian Favero (Laboratory of Parasitic Biology, School of Sciences, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)
Co-Authors	Vivian Favero (corr-auth) , Angela R. Piovesan , Alessandra L. Morassutti , Carolina De Marco Veríssimo , André A. Souto , Hélio R. Bittencourt , Vanessa F. Pascoal , Catieli G. Lindholz , Malcolm K Jones , Renata P. Souza , Francine De Vargas Rigo , Célia R. Carlini , Carlos Graeff-Teixiera
Abstract	Schistosomiasis remains a serious public health problem in intertropical regions, affecting more than 250 million people. In addition, its elimination requires sensitive diagnostic methods. Advances ... View full abstract
Significance Statement	Although sanitary improvements, treatment, and environmental control have reduced the intensity of transmission the schistosomiasis in various localities around the world, identification of infected individuals ... View full Significance Statement
Suggested Editorial Board Member	Tobin Marks (Northwestern University)
Suggested Editor	Shelley Berger (University of Pennsylvania)

A new diagnostic strategy which uses a luminol-H₂O₂ system to detect *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments processed by the Helmintex method

Vivian Favero^{1,2}, Angela R. Piovesan^{3,4}, Alessandra L. Morassutti¹, Carolina De Marco Veríssimo⁵, André A. Souto⁶, Hélio R. Bittencourt⁷, Vanessa F. Pascoal¹, Catieli G. Lindholz¹, Malcolm K. Jones⁸, Renata P. Souza¹, Francine De Vargas Rigo¹, Célia R. Carlini^{1,2,3} and Carlos Graeff-Teixeira²

1- Laboratory of Parasitic Biology, School of Sciences, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 Partenon – Porto Alegre/RS, CEP: 90619-900, Brazil.

2- Neurotoxins Laboratory (LaNeroTox), School of Medicine, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 Partenon – Porto Alegre/RS, CEP: 90619-900, Brazil.

3- Brain Institute (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 Partenon – Porto Alegre/RS, CEP: 90619-900, Brazil.

4- Biotechnology Center, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Agronomia, Porto Alegre - RS, 90650-001, Brazil

5- School of Biological Sciences, University Road, Belfast, BT7 1NN, Northern Ireland, United Kingdom

6- Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 Partenon – Porto Alegre/RS, CEP: 90619-900, Brazil.

7- Polytechnic School, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 Partenon – Porto Alegre/RS, CEP: 90619-900, Brazil.

8- School of Veterinary Science, The University of Queensland, Brisbane, QLD 4072 Australia.

*Corresponding author: Vivian Favero

Address: Av Ipiranga 6690, Porto Alegre RS, Brazil, 90690-900

Phone: +55 51 33203000 ext. 2170 or +55 51 33203500 ext. 4144

Fax: +55 51 33203568

E-mail: vivifavero@hotmail.com.br

ABSTRACT

Schistosomiasis remains a serious public health problem in intertropical regions, affecting more than 250 million people. In addition, its elimination requires sensitive diagnostic methods. Advances in the use of luminol-based chemiluminescent techniques have enabled greater sensitivity and speed in obtaining results in different diagnostic settings. In this study, we developed a luminol-H₂O₂ chemiluminescence (CL) method to detect *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) eggs in human fecal sediments processed by the Helmintex (HTX) method. Briefly, eggs from different sources were incubated with a solution of luminol-H₂O₂ and then were analyzed by a spectrophotometer at 431 nm for 5 min. The presence of eggs was also confirmed by optical microscopy. CL intensity was found to correlate with different sources and numbers of eggs. Furthermore, positive versus negative results were obtained with 100% sensitivity and 71% specificity. To our knowledge, this is the first study to report the use of CL for the diagnosis of helminths from fecal sediments. Moreover, combination of the HTX method with CL represents an important advance in providing a reference method with the highest standards of sensitivity.

Keywords: Schistosomiasis; Helmintex; Chemiluminescence;

1. INTRODUCTION

Among the parasitic diseases that occur in developing countries, schistosomiasis is considered the second most important in terms of socioeconomic effects, prevalence, and public health, second only to malaria (1-4). Schistosomiasis affects more than 250 million individuals worldwide, and three species are the most common sources of human infections: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), and *Schistosoma japonicum* (3, 5-7). There are a large number of endemic countries who are engaged in efforts led by the World Health Organization to eliminate the transmission of schistosomiasis (7).

Highly sensitive diagnostic tests have a pivotal role in detecting the late stages of elimination and confirming that transmission has been interrupted (8). Therefore, the development of sensitive and rapid diagnostic molecular methods, which are also simple to perform and inexpensive, is a top priority (8-11). Furthermore, these parameters for a diagnostic method would facilitate its widespread use. Currently, a urine-based test provides rapid detection of circulating cathodic antigen (POC-CCA) (11-14). The latter method has also exhibited better performance than egg detection by the Kato-Katz method (15) in high endemic localities (16-20). However, the POC-CCA method has exhibited reduced accuracy in the diagnosis of low intensity infections (2, 21, 22).

The highly sensitive Helmintex (HTX) diagnostic method detects *S. mansoni* eggs in clinical samples by isolating them from a large volume of feces with paramagnetic particles (PMP) placed in a magnetic field. This method exhibits 100% sensitivity for egg numbers greater than 1.34 eggs per gram of feces (23). Consequently, this method has been proposed as a gold standard for evaluating the diagnostic accuracy of other methods (23). However, despite the high sensitivity of the HTX method, and recent improvements to the method introduced by Favero and collaborators (24), the HTX method remains laborious. The most time consuming aspect of the HTX method is the rate-limiting final step which involves screening of the final sediment by microscopy to identify eggs.

Among the experiments which have been performed to establish proof of concept for the HTX method, one compared the binding affinity of three sets of PMP which only differed in the surface functionalization of the particles used. The particles functionalized with streptavidin produced the highest rate of egg isolation (23). Thus, it was hypothesized that biotin-like molecules are present on the surface of *S. mansoni* eggs. This hypothesis was later confirmed, thereby leading to the successful application of a chemiluminescence (CL) reaction to more rapidly detect eggs present in sediment processed by the HTX method. Therefore, here we report the development and standardization of an innovative luminol-H₂O₂ system for the rapid detection of *S. mansoni* eggs in human fecal sediments processed by the HTX method.

2. RESULTS

2.1. *S. mansoni* eggs emit a strong and persistent visible light when exposed to luminol-H₂O₂ solution

Visible blue light was observed when 25 *S. mansoni* eggs (L-eggs, Iv-eggs, and HF-eggs) were incubated with a luminol-H₂O₂ solution (Figure 1). In particular, the L-eggs and Iv-eggs preparations produced light emission for longer than 10 min, while the HF-eggs only exhibited light emission for 3 min. Similarly, the positive control (1:4000 diluted M-blood) exhibited an intense emission of light for only 3 min.

2.2. Light intensity is proportional to the number of eggs in a sample

CL generated by different numbers of *S. mansoni* eggs was quantitatively analyzed at 431 nm. The CL generated by L-eggs, Iv-eggs, and HF-eggs preparations varied according to the number of eggs present (Figure 2 A). Furthermore, a statistical analysis to compare AUC values for the different samples (Kruskal-Wallis test) showed that the samples containing 25 eggs emitted significantly greater CL intensity compared to the samples containing 10 eggs (Figure 2 B). In contrast, HF-Eggs, miracidia, and eggshell samples only containing 10 eggs each exhibited no significant difference in CL intensity (Figure 2, C e D).

2.3. *S. mansoni* eggs isolated with the HTX method can be distinguished from controls based on CL intensity

S. mansoni and *A. lumbricoides* eggs obtained from fecal sediments were prepared as samples containing 10, 25, or 50 eggs for CL analysis. The samples containing 10 or 25 *A. lumbricoides* eggs emitted less intense light compared with the *S. mansoni* samples containing similar numbers of eggs (HF-eggs-PMP). However, the samples containing 50 *A. lumbricoides* eggs exhibited the same light intensity as the *S. mansoni* samples containing 25 or 50 eggs (Figure 3 C).

The M-blood and Neg-HF (1:3) samples generated strong CL signals when incubated with the luminol-H₂O₂ solution. In addition, different dilutions of M-blood and

numbers of washing steps for Neg-HF (1:3) were performed (Figure 3, A, B and D). For the latter, the greater number of washes resulted in a significant reduction in CL signal (Kruskal-Wallis test, followed by nonparametric multiple comparisons (Figure 3A). Low CL intensity was also observed when several chemical reagents from the HTX method were individually tested (Figure 4). When luminol was absent (blank samples), significantly lower CL values were obtained (Figure 4).

2.4. Positive and negative human samples of *S. mansoni* can be distinguished by their CL

The CL curve obtained from analyzing sediments of human samples prepared with the HTX method shows that the samples analyzed differed in the intensity of their CL signals, with the egg-positive samples producing higher light intensities (Figure 5). After the spectrophotometry assays were completed, 200 μL aliquots of the same samples were screened by optical microscopy. We found that light intensity correlated with the number of eggs present (Table 2). Furthermore, a ROC curve analysis established a cut-off value at the 3.51×10^5 CL peak which produced an estimated 100% sensitivity and 71% specificity for the detection of true-positive samples (Figure 5). Another interesting observation was that the CL peak always registered 1 min before the spectrophotometry readings were made.

3. DISCUSSION

CL results from the production of electromagnetic radiation by a chemical reaction that can occur in solid, liquid, or gaseous systems (27). Detection methods based on the CL of luminol have exhibited high sensitivity, while also being cost effective (28). Thus, luminol has been widely used in analytical applications since the 1960s (29) in the fields of molecular biology and analytical chemistry (30-35). In addition, many compounds with a high oxidation capacity have been shown to emit light following exposure to luminol. These compounds include: peroxidases, molecules containing ferric or ferrous ions, other metal ions (e.g., cobalt, copper, and manganese), or active redox proteic groups (e.g., heme peroxidases, catalase, cytochromes and non-heme biomolecules, such as

the iron sulfur enzyme and the electron transfer proteins, rubredoxins and ferredoxins) (36, 37).

The schistosome eggshell and miracidia both contain divalent metal ions such as iron (38) and copper (39, 40), and/or proteins which contain metals, such as thioredoxin peroxidase (39), thioredoxin, superoxide dismutase, and iron-dependent peroxidase (40, 41). The results from ongoing investigations in our laboratory suggest that there are large amounts of metal ions present in miracidia. The presence of these molecules may explain the similar CL intensity that is observed following the incubation of *S. mansoni* eggs (both eggshells and HF-Eggs) and miracidia with luminol. It remains for these molecules to be directly detected in eggs which are eliminated in feces, although spectrometric analyses have been performed with eggs recovered from liver tissues (25).

PMP, which contain iron oxide, are used in the HTX method. PMP have been shown to adhere to the surface of eggs (38), and this would explain the intensified CL peak and dynamic spectrometric data observed for the HF-Eggs-PMP samples in the present study. Free PMP may also enhance CL, and this justifies performing extended washing steps in the HTX method to remove unbound PMP. Meanwhile, bound PMP should improve the capacity of CL reactions to distinguish true-positive from false-positive results.

Stools from a healthy adult contain approximately 0.2–0.9 mg of iron (42), which can derive from exogenous sources or mucosal bleeding (43-45). This iron content can potentially lead to background CL and false positive detection. By including several washing and sieving steps in the HTX method, including the use of a final sieve with 45- μm openings, blood cells and other smaller particles and molecules can be removed to prevent iron contamination (23, 24). However, when whole blood diluted 1:4 x 10^5 was incubated with luminol in the present study, significantly lower CL was detected. This result suggests that blood contamination is not a problem.

It is noteworthy that most of the experiments reported in the literature use eggs obtained from mouse liver tissue, probably due to the difficulties associated with harvesting sufficiently large numbers of eggs from human feces. However, there are several indications that eggs in feces differ from eggs recovered from liver.

Correspondingly, in the present study, higher CL intensity was exhibited by the L-Eggs compared to the HF-Eggs (Figure 2, A and B). It is important to consider these differences not only in relation to tissue/fecal sources, but also in relation to human versus experimental animal sources.

CL intensities varied with time when sediments from naturally infected human feces were analyzed. In addition, egg-negative samples produced lower CL intensities which facilitated establishing a cutoff value of 3.51×10^5 . (Figure 5). When 100 μ L of each sediment sample was analyzed according to this cutoff value, a reliable diagnosis was achieved with estimated 100% sensitivity and 71% specificity. However, it was observed that a 100 μ L sample aliquot that did not contain any eggs produced a positive CL peak, while an examination of the remaining sediment sample was positive for *S. mansoni* eggs. A possible explanation for this finding is that fragments, or even molecules, which are released by eggs can trigger a 71% specific CL reaction. If an accurate diagnosis could be achieved by only evaluating the CL of 100 μ L samples, without needing to evaluate all of the sediment for a sample, the time to complete a diagnosis would be markedly reduced. Currently, the time for diagnosis is a major drawback of the HTX method. It is also possible that an evaluation of CL could be incorporated into a screening procedure that employs a multi-step detection process in which only the CL-positive samples would be analyzed by microscopy to confirm the presence of eggs.

Oxidative activity is widespread in nature, although a characteristic pattern for light emission by *S. mansoni* eggs was observed with time (Figure 2 A and 4 A), The present findings also indicate that the dynamics of CL intensity with time (represented by AUC values) is positively associated with egg burden, and thus can serve as a quantitative basis for evaluating infections. Discrimination of true-positive samples was achieved with application of a CL peak cutoff value. It remains to be determined whether CL can be applied to the detection of other helminth eggs. Previously, *Ascaris lumbricoides* eggs were tested for CL reactivity as specificity controls because eggs with a diameter greater than 45 μ m are retained with *S. mansoni* eggs during the final sieving step in the HTX method. It was observed that *A. lumbricoides* egg suspensions with more than 25 eggs per 100 μ L of sample produced a CL peak greater than the cutoff

value established for *S. mansoni* detection (Figure 3C). This preliminary observation should be further investigated in order to improve the specificity of schistosomiasis diagnosis by a HTX/CL combined procedure, while also exploring the utility of the CL reaction in detecting other helminthic infections.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study to apply CL to the detection of helminth eggs in fecal sediments. This innovative procedure reduced the time to detect *S. mansoni* eggs in HTX sediment samples from approximately 10 min to 1 min per sample. In addition, at least eight samples were simultaneously read by a spectrophotometer. The ability to standardize an effective luminol-H₂O₂ detection step for the HTX method reinforces the proposed role for the HTX method to serve as a reference parasitological method. Furthermore, the development of a highly sensitive and less laborious diagnostic method should facilitate efforts to eliminate schistosomiasis.

4. METHODOLOGY

4.1. *S. mansoni* eggs and miracidia

The Laboratory of Parasite Biology of the School of Sciences (PUCRS) maintains the cycle of *S. mansoni* by using mollusks of the genus, *Biomphalaria* sp., as an intermediate host and a Swiss strain of *Mus musculus* as a definitive host (Animal Ethics Committee – PUCRS CEUA 15/00443).

For this study, 50 days after mice were infected with *S. mansoni*, they were anesthetized with 5% isoflurane (BioChimico, Brazil) and then received an intraperitoneal injection of 100 µL sodium heparin (5000 IU/mL, HEPAMAX-S, Brazil). After 10 min, the animals were euthanized with CO₂ anesthetic depression. *S. mansoni* adult worms were subsequently recovered by perfusion and livers were removed. Blood samples were also obtained to serve as positive controls (M-blood) in CL reactions.

Eggs from these murine experimental infections were prepared according to the following methods (Table 1).

Liver eggs (L-Eggs) were obtained according to the method of Dalton and colleagues (25). In brief, mouse livers were digested in a solution containing 10 µg

collagenase B (Sigma-Aldrich, Germany) and 10 µg penicillin-streptomycin (Gibco, USA) in 1X PBS at 37 °C overnight. The resulting tissue material was then sieved through a 150-µm mesh and the eggs that were recovered were further purified by using a Percoll gradient (Sigma-Aldrich, Germany). An aliquot of the purified eggs was added to distilled water and exposed to light in a chamber at 27 °C for 1 h to allow hatching of the miracidia.

In vitro eggs (Iv-Eggs) were obtained from adult *S. mansoni* worms cultured in DMEM medium (Gibco, USA) containing a high concentration of glucose (4.5 g/L), 10% fetal bovine serum (CRIPION, Brazil), and 10% penicillin-streptomycin. The worms were maintained in media at 37 °C and 5% CO₂. Media was changed daily and laid eggs were collected.

S. mansoni eggs (L-Eggs and IV-Eggs) and miracidia were successively isolated from other debris with repeated (4x) capture by pipetting under an optical microscope. Eggs and miracidia were separated into groups of 10, 25, and 50 in tubes containing 1X PBS (pH 7) and were stored at - 20 °C.

4.2. Isolation of *S. mansoni* eggs from human samples

Work with human samples was approved by the Ethics Committee of the René Rachou Research Center (FIOCRUZ, 21824513.9.0000.5091) and the Research Ethics Committee of PUCRS (48809715.1.0000.5336). Human fecal samples were obtained from epidemiological studies performed in the municipalities of Januária, Minas Gerais, and Estancia, Sergipe, Brazil (21, 26). All volunteers provided informed consent. The collected samples were separated into two groups, according to the method used to process them, as described below (Table 1).

Human fecal eggs (HF-eggs): Fecal samples were subjected to the HTX method (24), although PMP were not added to the final sediment. *S. mansoni* eggshells were also separated from these samples and stored at - 20 °C until needed.

Human feces eggs with PMP (HF-eggs-PMP): Fecal samples were subjected to the HTX method and PMP were added to the final sediment. From this sediment,

Ascaris lumbricoides (*A. lumbricoides*) eggs were isolated for CL experiments (see 2.7.3).

S. mansoni eggs (HF-Eggs and HF-Eggs-PMP), eggshells, and *A. lumbricoides* eggs were successively isolated from other debris with repeated (4x) capture performed with pipetting under an optical microscope. Both eggs and eggshells were separated into groups of 10, 25, and 50 in tubes containing 1X PBS (pH 7) and were stored at -20 °C.

4.3. Processing of negative control human samples

To obtain human negative control samples (Neg-HF, see Table 1), stool samples from ten healthy individuals were processed according to the HTX method, but without the addition of PMP. Microscopic examinations of these sediments showed them to be negative for eggs. The final pellets for several of these samples were then pooled, homogenized, and two 1 mL aliquots were placed in microtubes (labeled 1 and 2) each containing 1 mL PBS and 19 µL PMP. After 30 min of orbital agitation, the samples were placed in a magnet field to isolate a pellet (HTX methodology (23)). Each pellet obtained from microtubes 1 and 2 were separately resuspended in PBS (1:1), washed 6x (with centrifugation performed after each wash, 2 min, 200 x g), and resuspended in PBS (1:1). A 100 µL aliquot from the microtube 1 sample was reserved after each wash for CL experiments. Meanwhile, the pellet obtained from microtube 2 was diluted 1:1, 1:2, and 1:3 in 1X PBS and these samples were stored at -20 °C.

4.4. Luminol - H₂O₂ solution

The luminol-H₂O₂ solution used was composed of: 40 mM luminol (Sigma-Aldrich, USA), 10 mM KOH (Nuclear, Brazil), and 17 mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Germany). The solution was always prepared immediately before use and it was protected from light.

4.5. CL detection

Samples (100 μ L each) were placed in opaque polystyrene plates (OptiPlate-96, Brazil) and 100 μ L luminol- H_2O_2 solution was added with a multichannel pipette immediately before analysis.

A naked-eye check for emitted light was performed after 15 min in a darkroom at 24 °C. Samples were imaged (Nikon, Coolpix P600) 1, 3, and 10 min after the luminol- H_2O_2 solution was added.

CL was also detected with a spectrophotometer (Molecular Devices, SpectraMax[®] M3) that was adjusted to a temperature of 27 °C. To confirm the ideal wavelength for CL analysis, an initial scan ranging from 300 nm to 600 nm was performed. CL values were subsequently recorded for 5 min at 431 nm.

4.6. Experiments

4.6.1. Verification of visible light emission from samples containing eggs

To verify visible light emission generated by the CL reaction, triplicate samples of 25 L-Eggs, 25 Iv-Eggs, 25 HF-Eggs, M-blood diluted in 1X PBS (1:4.000; positive control), and 1X PBS (negative control) were incubated with the luminol- H_2O_2 solution and then were visually inspected.

Next, wavelength was analyzed for independent triplicate samples of 10 L-Eggs, 10 HF-Eggs-PMP, 10 HF-Eggs, 100 μ L Neg-HF (1:3), 100 μ L M-blood diluted in 1X PBS (1: 4.000), and 100 μ L PBS 1X samples. Blue-colored luminescence observed with the naked eye corresponds to a wavelength ranging from 380 nm to 495 nm, the expected range for luminol-induced luminescence. A 431 nm CL peak was detected in all of the, except in the Neg-HF samples which exhibited a wave peak at 420 nm.

4.6.2. Evaluation of CL from *S. mansoni* eggs and miracidia detected by spectrophotometry

CL measurements were collected for six independent replicates of 10-egg and 25-eggs samples of L. Eggs, Iv-Eggs, and HF-Eggs. To verify the luminescence values

emitted by miracidia and eggshells, six independent replicates of 10 miracidia and 10 eggshell samples were also analyzed under the same conditions.

4.6.2 CL of negative human samples

To better discriminate between non-infected and infected samples, and to facilitate handling of the final HTX processed sediments, we tested the effect of 6 washes of the HTX pellet and six replicates of different dilutions of Neg-HF in PBS (1:1, 1:2, or 1:3) on CL intensity. The lowest background reading was obtained when sediment was washed six times and the sediment was diluted 1:3 (Figure 3, A and B).

4.6.3. Evaluation of background CL of isolated reagents

The same conditions described in section 2.5 were applied to six independent replicates of 100 μ L luminol solution, 100 μ L PMP in 1X PBS (1:4000), 100 μ L ethyl acetate diluted in 1X PBS (1:4000), 100 μ L M-blood diluted in 1X PBS (1:400, 1:4000, and 1:400000), 100 μ L Neg-HF (1:3), 1X PBS, and samples of 10, 25, and 50 HF-eggs-PMP. In addition, six independent replicates of samples containing 10, 25, and 50 *A. lumbricoides* eggs were also evaluated.

4.6.4. CL produced by naturally infected human samples

Human stool samples (n = 30; obtained as described in 2.2 above) were processed according to the HTX method. From the final sediment samples obtained, 100 μ L of each was set aside for CL testing. The remaining final sediment samples were used to quantify the total number of *S. mansoni* eggs present by optical microscopy. After the CL test, the same 100 μ L sample was also analysed by optical microscopy to count the eggs present in order to analyze a possible correlation with the CL data.

4.7. Statistical Analysis

The experiments performed included a series of 16 measurements from 0-15 min (t₀–t₁₅) which are presented in two-dimensional graphs of CL intensity versus time. The

graphs present the mean CL intensity for the groups, although area under the curve (AUC) values were calculated individually to allow comparisons to be made. The latter were calculated based on the sum of the area of the rectangle with base of 19s and the height being the midpoint between $f(t)$ and $f(t+15)$. The final AUC value is the sum of all of the rectangle areas. To reduce the magnitude of the values, the sums were logarithmized. After the AUC values were compared, a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to establish a cutoff value to provide discrimination of positive samples. Comparisons among the different groups were performed by using the Kruskal-Wallis test, followed by a multiple comparisons nonparametric test, with a level of significance of 0.05. Box plots were constructed to present these results. The statistical software program, SPSS 17.0, was used to perform the statistical analyses for this study.

Acknowledgments

Financial support was provided by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Brasil (CNPq), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)“ edital 32/2010”. C. Graeff-Teixeira is a recipient of a CNPq PQ 1D fellowship and grants (307005/2014-3). We also thank Dr. Stefan M. Geiger from the Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Dra. Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo from Universidade de Tiradentes - Sergipe, and Dr. Claudio Cerqueira Lopes, Claudio Cerqueira Lopes; Rosangela Sabbatini Capella Lopes; Letícia Gomes Ferreira Chantre from LASAPE/ UFRJ.

REFERENCES

1. McCarthy JS, *et al.* (2012) A research agenda for helminth diseases of humans: diagnostics for control and elimination programmes. *PLoS neglected tropical diseases* 6(4):e1601.
2. Rollinson D, *et al.* (2013) Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta tropica* 128(2):423-440.
3. CTG OR, VJG YRE, & KPVQ VCT (Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by infection with parasitic flatworms of the genus *Schistosoma*. The clinical manifestations (intestinal, hepato-splenic and.
4. Bockarie MJ, Kelly-Hope LA, Rebollo M, & Molyneux DH (2013) Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. *Phil. Trans. R. Soc. B* 368(1623):20120144.
5. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, & Kestens L (2006) Human schistosomiasis. *The Lancet* 368(9541):1106-1118.
6. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, & King CH (2014) Human schistosomiasis. *The Lancet* 383(9936):2253-2264.
7. Lo NC, *et al.* (2017) A call to strengthen the global strategy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: the time is now. *The Lancet infectious diseases* 17(2):e64-e69.
8. Bergquist R, Johansen MV, & Utzinger J (2009) Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? *Trends in parasitology* 25(4):151-156.
9. Pontes LA, 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.
10. Sandoval N, *et al.* (2006) *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Experimental parasitology* 114(2):84-88.

11. Deelder A, *et al.* (1994) Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. *Tropical and geographical medicine* 46(4 Spec No):233-238.
12. De Clercq D, *et al.* (1997) Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections in Office du Niger, Mali. *Tropical Medicine & International Health* 2(7):680-685.
13. Disch J, *et al.* (1997) Daily fluctuation of levels of circulating cathodic antigen in urine of children infected with *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91(2):222-225.
14. Polman K, Engels D, Fathers L, Deelder AM, & 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.
15. Katz N, Chaves A, & Pellegrino J (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14(6):397-400.
16. Verani JR, *et al.* (2011) Schistosomiasis among young children in Usoma, Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84(5):787-791.
17. Sousa-Figueiredo JC, *et al.* (2010) Treatment of intestinal schistosomiasis in Ugandan preschool children: best diagnosis, treatment efficacy and side-effects, and an extended praziquantel dosing pole. *International Health* 2(2):103-113.
18. Stothard JR, *et al.* (2011) *Schistosoma mansoni* infections in young children: when are schistosome antigens in urine, eggs in stool and antibodies to eggs first detectable? *PLoS neglected tropical diseases* 5(1):e938.
19. Coulibaly JT, *et al.* (2013) Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. *PLoS neglected tropical diseases* 7(3):e2109.
20. Shane HL, *et al.* (2011) Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya. *PLoS neglected tropical diseases* 5(1):e951.

21. Lindholz CG, *et al.* (2018) Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candéal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 12(3):e0006274.
22. Ortu G, *et al.* (2017) Countrywide reassessment of *Schistosoma mansoni* infection in Burundi using a urine-circulating cathodic antigen rapid test: informing the national control program. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96(3):664-673.
23. Teixeira CF, 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.
24. Favero V, *et al.* (2017) Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. *Experimental parasitology* 177:28-34.
25. Dalton J, Day S, Drew A, & Brindley P (1997) A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. *Parasitology* 115(1):29-32.
26. Oliveira WJ, *et al.* (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.
27. Wiedemann E (1888) Ueber Fluorescenz und Phosphorescenz I. Abhandlung. *Annalen der Physik* 270(7):446-463.
28. Khan P, *et al.* (2014) Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Applied biochemistry and biotechnology* 173(2):333-355.
29. Albertin R, *et al.* (1998) Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova* 21(6):772-779.
30. Riaz U, *et al.* (2017) Influence of Luminol Doping of Poly (o-phenylenediamine) on the Spectral, Morphological, and Fluorescent properties: A Potential

- Fluorescent Marker for Early detection and Diagnosis of Leishmania donovani. *ACS applied materials & interfaces* 9(38):33159-33168.
31. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, & Lago G (2007) Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* 72(3):896-913.
 32. Campaña AG, Rodríguez LC, González AL, Barrero FA, & Ceba MR (1997) Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. *Analytica chimica acta* 348(1-3):237-246.
 33. Yuan J & Shiller AM (1999) Determination of subnanomolar levels of hydrogen peroxide in seawater by reagent-injection chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry* 71(10):1975-1980.
 34. Roda A, *et al.* (2000) Bio-and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 366(6-7):752-759.
 35. Yamaguchi M, Yoshida H, & Nohta H (2002) Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 950(1-2):1-19.
 36. Wilson R & Schiffrin D (1996) Chemiluminescence of luminol catalyzed by electrochemically oxidized ferrocenes. *Analytical chemistry* 68(7):1254-1257.
 37. Lindley PF (1996) Iron in biology: a structural viewpoint. *Reports on Progress in Physics* 59(7):867.
 38. Karl S, *et al.* (2013) The iron distribution and magnetic properties of schistosome eggshells: implications for improved diagnostics. *PLoS neglected tropical diseases* 7(5):e2219.
 39. Bexkens ML, *et al.* (2011) The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. *International journal for parasitology* 41(5):523-532.
 40. Mathieson W & Wilson RA (2010) A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *International journal for parasitology* 40(5):617-628.

41. Wang T, *et al.* (2016) Proteomic analysis of the *Schistosoma mansoni* miracidium. *PloS one* 11(1):e0147247.
42. Lund EK, Wharf SG, Fairweather-Tait SJ, & Johnson IT (1999) Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers-. *The American journal of clinical nutrition* 69(2):250-255.
43. Glaser J (2014) Gastrointestinale Blutungen im fortgeschrittenen Lebensalter. *Zentralblatt für Chirurgie-Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-und Gefäßchirurgie* 139(04):411-414.
44. Owensby S, Taylor K, & Wilkins T (2015) Diagnosis and management of upper gastrointestinal bleeding in children. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 28(1):134-145.
45. Sealock RJ, Thrift AP, El-Serag HB, & Sellin J (2018) Long-term follow up of patients with obscure gastrointestinal bleeding examined with video capsule endoscopy. *Medicine* 97(29).

Figure legends

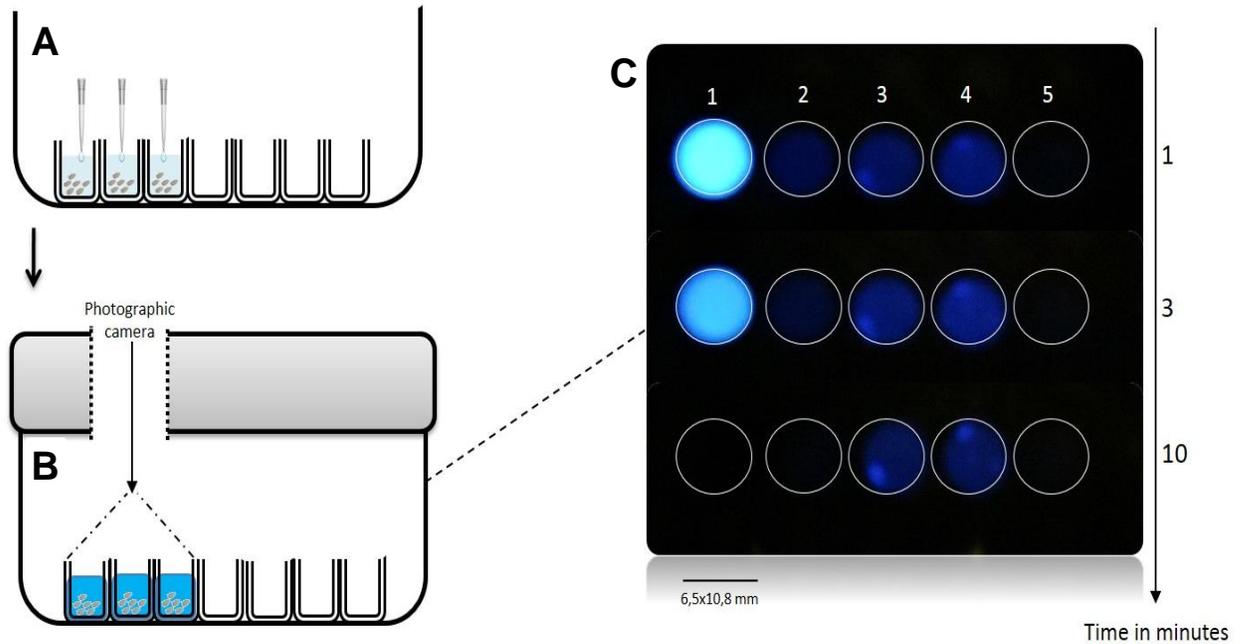


Figure 1: Visible light emission by a sample of *S. mansoni* eggs incubated with luminol-H₂O₂ solution. **A-** Illustration of triplicate samples in an opaque 96-well plate to which luminol solution is added. **B-** A standardized cover is placed on the plate which allows photographic documentation of CL development. **C-** Imaging of the CL that developed 1, 3, and 10 min after the addition of luminol. **1-** Positive control (M-blood 1:400); **2-** 25 HF-eggs; **3-** 25 L-eggs; **4-** 25 Iv-eggs, and **5-** Negative Control (1X PBS).

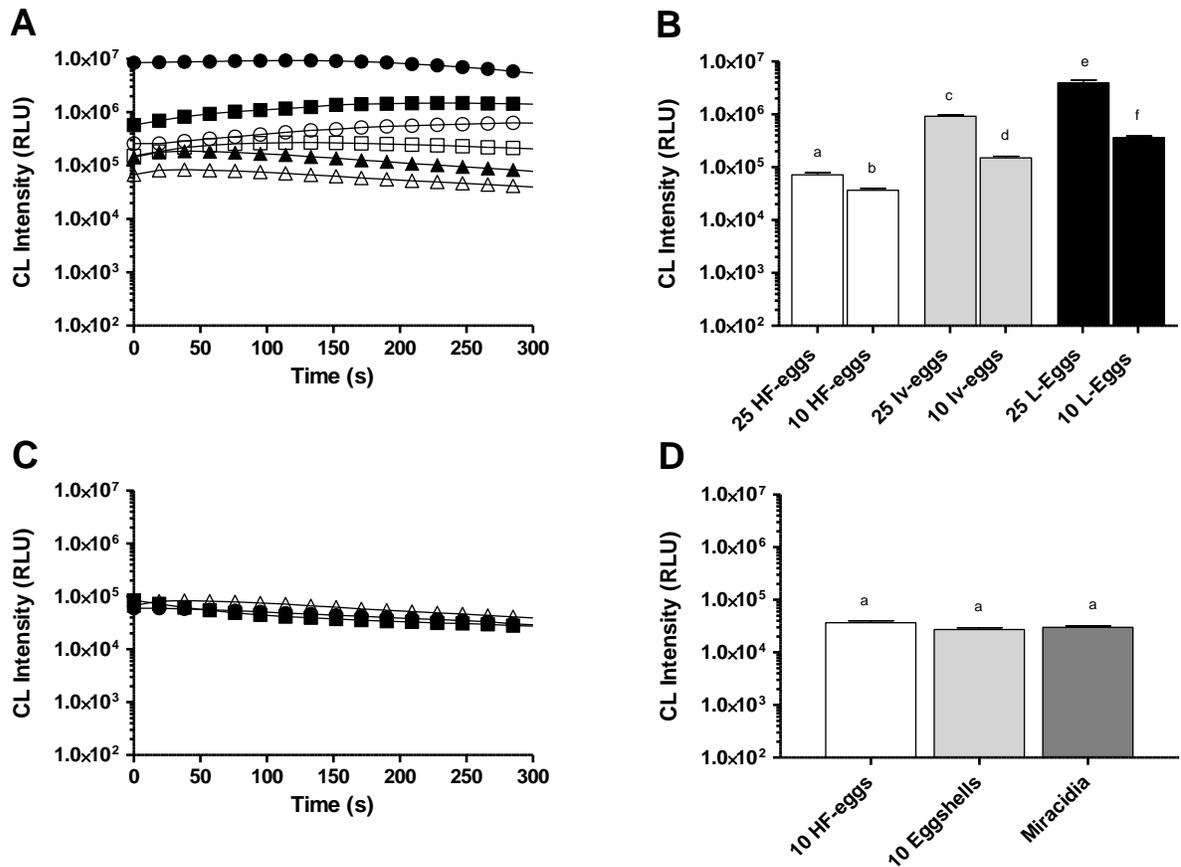


Figure 2: Quantification of CL in *S. mansoni* eggs samples. CL intensity profile (in relative light units, “RLU”) obtained at 431 nm with a spectrophotometer: **A** - 10 (○, □, △) and 25 (●, ■, ▲): L-Eggs (○, ●), Iv-eggs (□, ■) and HF-eggs (△, ▲). **B** - Bar graph representing the estimated AUC values of 25 egg versus 10 egg HF-Eggs, L-Eggs, and Iv-Eggs samples. Groups labeled with letters differ significantly at the 0.05 level according to the multiple comparison test. **C**- CL intensity profile for eggshells (●), miracidia (■) and HF-eggs (△); **D**- Bar graph representing the estimated AUC values for samples containing HF-eggs, eggshells, and miracidia as indicated. Significant differences were not observed.

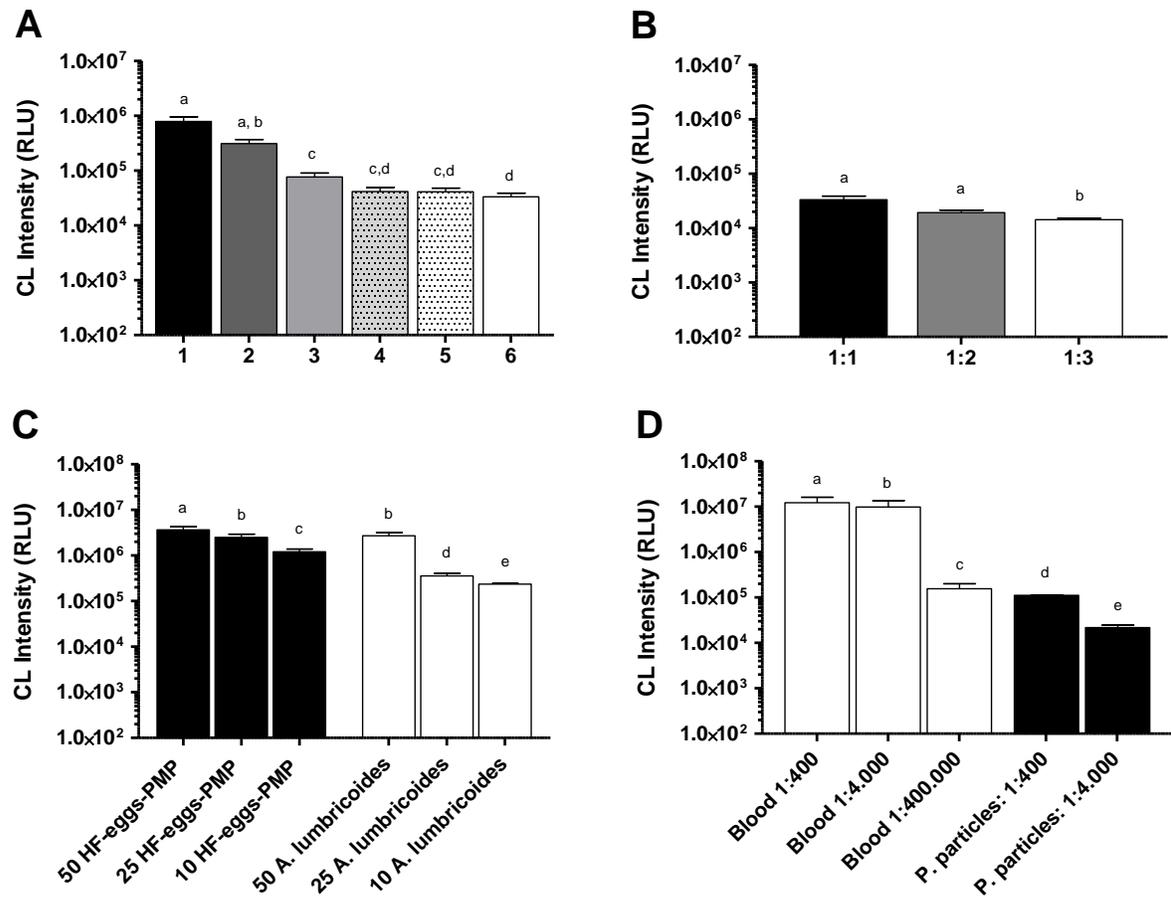


Figure 3: Comparison of CL signals between *S. mansoni* samples and potential sources of false-positivity. **A-** fecal sediment produced by Helmintex, from non-infected human individuals (Neg-HF). CI gradually reduces with six sequential wash steps. **B-** Neg-HF after 6 wash steps, diluted 1:1, 1:2, and 1:3 in PBS, with gradual CL reduction; **C-** Fecal sediments processed by the HTX method from naturally infected human individuals with 50, 25, and 10 eggs, including PMP (HF-eggs-PMP). In addition, *A. lumbricoides* samples containing 50, 25, and 10 eggs were analyzed. **D-** CL intensity profile for whole rodent blood (diluted 1:400, 1:4,000, and 1:400,000) and PMP diluted 1:400 and 1:4,000. Bar graphs represent AUC values for CL intensity plotted with time. The letter labels indicate significant differences (0.05) according to the multiple comparison test.

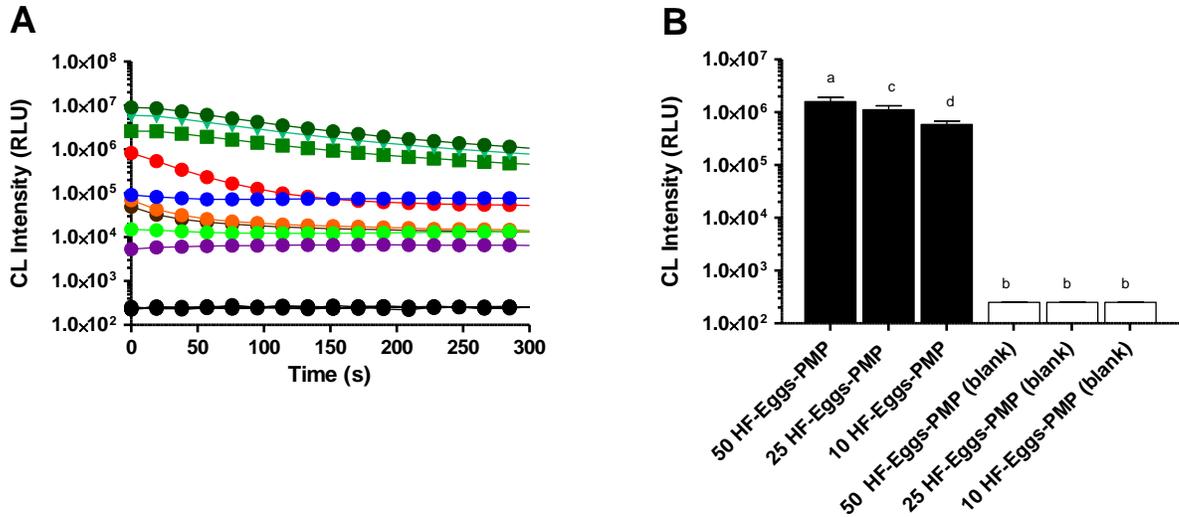


Figure 4: Comparison of CL intensity generated by *S. mansoni* eggs and several negative controls and blood as a positive control. A- CL intensity profile at 431 nm for: 50 (●), 25 (▼) and 10 (■) eggs obtained from naturally infected humans, processed according to the HTX method, and including PMP (HF-Eggs-PMP), mouse blood diluted 1:400,000 as a positive control (M-blood, ●), fecal sediment from non-infected human individuals processed by the HTX method (Neg-HF, ●) and reagents used in the HTX method, including: luminol- H_2O_2 : ethyl acetate (●), paramagnetic particles (PMP, ●), PBS (●) and luminol (●). All of the “blank” samples converged to the same CL intensity (●). **B-** Bar graphs presenting estimated AUC values for the samples described in **A**. Letter labels indicate significant differences (0.05) according to the multiple comparison test.

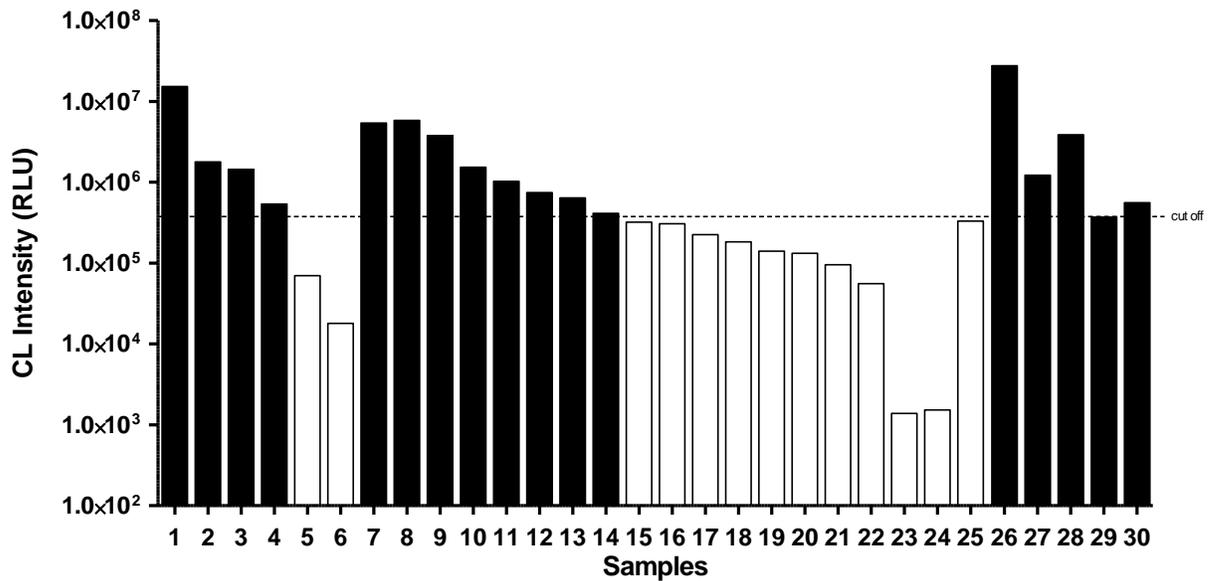


Figure 5: CL intensity distinguishes human samples infected and not infected with *S. mansoni* and processed by the HTX method. CL peak of HTX sediments classified according to a cut-off value of 3.51×10^5 . CL-positive (black bars) and CL-negative (empty bars) are shown. Sample 12 represents a CL-positive sediment which had no eggs observed by microscopy in the remaining total sediment.

Table 1 – Types of preparations subjected to luminol-H₂O₂ chemiluminescence reactions according to their biological material and host.

Sample label	Biological Material	Host
L-Eggs	Digestion of liver tissue according to Dalton and colleagues (25)	Mouse
Iv-Eggs	<i>In vitro</i> cultured worms	Mouse
HF-eggs	Fecal samples from naturally infected individuals, HTX method, – PMP	Human
HF-Eggs-PMP	Fecal samples from naturally infected individuals, HTX method, + PMP	Human
Neg-HF	Fecal samples from healthy, non-infected individuals, submitted to HTX method	Human

PMP: paramagnetic particles; HTX: Helmintex.

Table 2 – Comparison of CL peaks and numbers of *Schistosoma* eggs detected for 100 μ L aliquots and total samples of sediment obtained from naturally infected human individuals and prepared with the HTX method.

Sample number	HTX final sediment volume (μ L)	No. eggs in 100 μ L aliquot of HTX sediment	CL peak	No. eggs in total HTX sediment
1	700	45	1.53×10^7	1234
2	1000	11	1.78×10^6	1181
3	600	9	1.44×10^6	104
4	400	5	5.40×10^5	98
5	850	0	6.98×10^4	0
6	1500	0	1.80×10^4	0
7	460	21	5.40×10^6	850
8	1700	36	5.85×10^6	836
9	630	13	3.80×10^6	432
10	720	8	1.53×10^6	59
11	750	0	1.03×10^6	2
12	470	0	7.46×10^5	0
13	760	0	6.42×10^5	22
14	730	0	4.13×10^5	1
15	1540	0	3.21×10^5	0
16	820	0	3.07×10^5	0
17	670	0	2.25×10^5	0
18	580	0	1.84×10^5	0
19	430	0	1.41×10^5	0
20	380	0	1.32×10^5	0
21	1280	0	9.75×10^4	0
22	290	0	5.59×10^4	0
23	740	0	1.39×10^3	0
24	750	0	1.53×10^3	0
25	410	0	3.32×10^5	0
26	1530	4	2.95×10^7	54
27	1220	1	1.22×10^6	21
28	750	3	3.89×10^6	63
29	750	3	3.70×10^5	13
30	380	1	5.60×10^5	4

HTX: Helmintex; CL: chemiluminescence.

4. ESTUDOS COMPLEMENTARES SOBRE O(S) COMPOSTO(S) RESPONSÁVEL(ÉIS) PELA QUIMILUMINESCÊNCIA EM OVOS DE *S. mansoni*

A seguir, descrevemos inúmeros experimentos, que contemplam informações substanciais sobre o entendimento do(s) composto(s) responsável(eis) pela quimiluminescência oriunda de ovos de *S. mansoni*, buscando entender os achados inéditos descritos no artigo submetido a revista PNAS denominado “A new diagnostic strategy which uses a luminol-H₂O₂ system to detect *Schistosoma mansoni* eggs in fecal sediments processed by the Helmintex method”, encontrado neste capítulo (página 68). Lembrando que nossa principal hipótese para tal fenômeno, tem como base, a existência de ions metálicos como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni) e manganês (Mn) em ovos de *S. mansoni*.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Ovos de *S. mansoni* obtidos em camundongos

O ciclo de *S. mansoni* é mantido pelo laboratório de Parasitologia Biomédica da Faculdade de Ciências da PUCRS através de passagens por moluscos dos gêneros *Biomphalaria* sp., e camundongos *Mus musculus*, cepa Swiss, com aprovação pelo Comitê de Ética em Animais - PUCRS (CEUA 15/00443).

No 50º dia de infecção, os camundongos são anestesiados com isoflurano a 5% para a administração de 100 µL de heparina sódica (HEPAMAX-S, Brasil) na cavidade peritoneal. Passados 10 minutos (min), os animais são novamente anestesiados com isoflurano a 5% e encaminhados para eutanásia por depressão anestésica com CO₂. Após, os camundongos são perfundidos para liberação dos vermes adultos e remoção dos fígados.

Os ovos de *S. mansoni* obtidos de fígado de camundongos, denominados (F-ovos), foram obtidos de acordo com Dalton (1997). Em resumo, os fígados de camundongos foram triturados e dissociados em uma solução contendo 10 µg de colagenase B (Sigma-Aldrich, Alemanha), 10 µg de penicilina-estreptomicina (Gibco, EUA) e 1X PBS, a 37 °C durante a noite. O material resultante foi peneirado através de uma malha de 150 µm e os ovos foram posteriormente purificados com gradiente de Percoll (DALTON, *et al.*, 1997). Uma parte dos ovos obtidos foram colocados em água destilada e expostos à luz, em câmara a 27 °C por 1 h, para a eclosão de miracídios.

Para a produção dos denominados ovos *in vitro* (Iv-ovos), vermes adultos de *S. mansoni* foram cultivados em meio DMEM (Gibco, EUA) contendo alta concentração de glicose (4,5 g/L), 10% de soro fetal bovino (CRIPION, Brasil) e 10% de penicilina-estreptomicina, a 37, 5% de CO₂. O meio foi mudado diariamente para coleta dos ovos.

1.2. Obtenção de ovos de *S. mansoni* em amostras de fezes humanas

Amostras fecais foram obtidas em dois grandes inquéritos realizados nos municípios de Januária/MG, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro

de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ (21824513.9.0000.5091), e em Estância/SE, com o registro do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. (48809715.1.0000.5336).

As amostras coletadas foram separadas em dois grupos de acordo com o método utilizado para processá-las.

Ovos de fezes humanas (FH-ovos): amostras fecais submetidas ao método Helmintex (Favero *et al.*, 2017), mas sem adição de partículas paramagnéticas ao sedimento final.

Ovos de fezes humanas com partículas paramagnéticas (FH-ovos-PMP): amostras fecais submetidas ao método Helmintex (Favero *et al.*, 2017), com adição de partículas paramagnéticas ao sedimento final.

1.3. Instrumentação

Todas as amostras contendo ovos foram centrifugadas com 1 mL de PBS 1X por 2 min a 200 x g (6x) para remoção de contaminantes que pudessem emitir luz, e após foram armazenadas em microtubos contendo 1 mL de PBS 1X (pH 7) a -20 °C, até seu uso.

A captura de ovos foi realizada em quatro etapas, em microscópio óptico com aumento de 4x: **1)** disposição de 50 µL de sedimento em lâmina simples (Pró-Cito, Brasil), diluição em 200 µL de PBS 1 X e captura com pipeta 10 µL; **2)** acondicionamento dos ovos em uma segunda lâmina com 200 µL de PBS 1 X e recaptura com pipeta 10 µL; **3)** acondicionamento dos ovos em uma terceira lâmina com 200 µL de PBS 1 X e recaptura com pipeta 10 µL; **4)** os ovos capturados da terceira lâmina foram acondicionados de acordo com o experimento a ser realizado.

A detecção de luminescência foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® M3), ajustado a uma temperatura de 27 °C. O registro de luminescência nas várias amostras ocorreu durante 5 min a 431 nm. Todas as amostras foram armazenadas em placas de poliestireno opaco de 96 poços (OptiPlate™-96, Brasil). A reação de quimiluminescência foi iniciada após a adição de 100 µL de solução de luminol, com o auxílio de pipeta multicanal.

1.4. Análise de elementos químicos na superfície de ovos de *S. mansoni*

1.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para verificar os elementos químicos existentes apenas na superfície dos ovos (cascas), três triplicatas contendo 50 ovos (FH-ovos, Iv-ovos, F-ovos) foram dispostas em lamínulas de 18 mm, previamente tratadas com uma solução de 0.1% Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) para melhor adesão dos ovos. Posteriormente, as lamínulas contendo os ovos foram lavadas com PBS 1X, desidratadas em série crescente de Etanol, submetidas à Hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich) e deixadas secar em temperatura ambiente, em exaustor. Após a secagem, as lamínulas foram depositadas em *stubs*, cobertas por deposição de íons metálicos (ouro) e levadas ao microscópio eletrônico de (FEG-SEM) Inspect F50 (FEI Company, Netherlands).

A análise qualitativa por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (FEG-SEM) acoplado ao detector de microanálise por modelo EDS XL30 (PHILIPS). Em cada amostra, um ovo foi analisado em 25 pontos de leitura EDS, em todo o seu comprimento. O microscópio foi operado com a tensão de aceleração a 20 KV, o a EDS foi realizada por 15 segundos em cada um dos 25 pontos.

1.4.2. Espectrometria de Retroespalhamento Rutherford (RBS)

Para determinar a composição química elementar da superfície dos ovos (cascas) de *S. mansoni*, triplicados contendo 130 ovos (F-ovos, FH-ovos e FH-ovos-PMP) foram depositados em uma fita de carbono dupla face de 0,5 mm montada sobre uma lamínula de vidro de 20 x 26 mm² (Figura 4), e colocada em estufa a 37 °C por 5 dias. A análise RBS foi realizada com o feixe de He⁺ a 2,0 MeV e o ângulo de detecção foi de 165° com relação à direção de incidência do feixe. As medidas de espectrometria RBS foram obtidas no acelerador eletrostático Tandetron de 3 MV do Laboratório de Implantação Iônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A curva de calibração do multicanal foi obtida analisando amostras contendo elementos

conhecidos na sua superfície (C, N, O e Si). A partir dos dados gerados, foi obtida uma reta de calibração das energias desses elementos na superfície das amostras padrão, em função do canal onde apareceram os sinais dos elementos. Essa reta é a base para a identificação da massa dos elementos detectados na amostra.

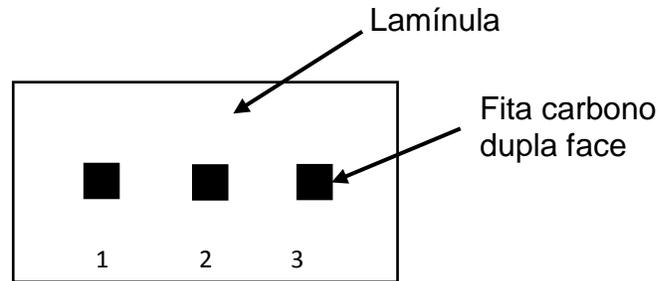


Figura 4: Ilustração de lamínula (20 x 26 mm²) contendo amostras de ovos de *S. mansoni* depositados sobre fita de carbono dupla face. 1- F-ovos; 2- FH-ovos; 3- FH-ovos-PMP.

1.5. Solução de Luminol – H₂O₂

A solução de luminol - H₂O₂, preparada 15 minutos antes do uso, continha 40 mM de luminol em pó (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 M de KOH (Nuclear, Brasil), dissolvidos em solução contendo 9,5 mL de H₂O deionizada com 0,5 mL de 1,7 mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Alemanha). A solução foi mantida em frasco escuro e refrigerada em geladeira (entre 6 e 10 °C) até o momento do seu uso.

1.6. Mecanismo de quimiluminescência

1.6.1. Preparação das amostras

Devido à dificuldade para obtenção de amostras de ovos de *S. mansoni* oriundos de fezes humanas, inicialmente optamos por dois grupos amostrais:

Ovos obtidos de fígados de camundongos (F-ovos): contendo 2.500 ovos dispostos em 5 mL de PBS 1X em pH 7, (equivalente a 50 ovos em 100µl de PBS 1X = 0,5 Un/µL).

Miracídios: 1.000 miracídios, dispostos em 4 mL de PBS 1X, pH 7, (equivalente a 25 miracídios em 100µl de PBS 1X = 0,25 Un/ µL).

Ambas as preparações foram sonicadas com auxílio de 500 pérolas de vidro (425 a 600 µm, Sigma) por 2 min a 60 kHz, com intervalos de 1 min (8x) em banho de gelo.

As amostras contendo ovos lisados foram centrifugadas a 200 x g para separação da porção solúvel (PS) e os fragmentos de cascas (FC). Após a retirada de 4,5 mL de PS, os FC passaram por mais uma centrifugação com PBS 1X (pH 7) com retirada de sobrenadante e ressuspensão de 4,5 mL de PBS 1X antes de sua utilização.

1.6.2. Absorbância

Com o objetivo de verificação se o agente emissor de quimiluminescência seria uma proteína, um metal, ou um metal ligado a uma proteína, inicialmente realizou-se uma varredura de absorbância no ultravioleta visível em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® M3), ajustado para uma temperatura de 27-27,5 °C, variando o comprimento de onda no intervalo de 200 a 400 nm. A leitura das amostras PS, FC e miracídios foram realizadas em placas de titulação de poliestireno incolor.

1.6.3. Medida da quimiluminescência

A luminescência foi detectada em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® M3), ajustado para uma temperatura de 27-27,5 °C, durante 5 min a 431 nm. Todas as amostras foram analisadas em placas de titulação de poliestireno opaco (OptiPlate™-96, Brasil). A reação de quimiluminescência foi iniciada com a adição de 100 µL de solução de luminol com o auxílio de pipeta multicanal. A intensidade das leituras foi expressa em RLU/min.

1.6.4. Efeito de quelantes, agentes oxidantes e redutores e altas temperaturas sobre a quimiluminescência

As primeiras experimentações para o esclarecimento da quimiluminescência tiveram a finalidade de investigar o estado redox e a presença de metais nas amostras. Para isto 2 h antes da experimentação, em temperatura ambiente 22 °C foi adicionado às amostras contendo 50 µl de soluções PS, FC e miracídios os compostos: Ditioneitol (DTT); 2-Mercaptoetanol; ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA); ácido Etileno-bis(oxietilenonitrilo) tetraacético (Egtazicacid ou EGTA), e Orto-Fenantrolina, nas concentrações de 20 mM e 50 mM.

A termo estabilidade do(s) composto(s) em estudo foi verificada por fervura, a 100 °C por 5 min, dos microtubos contendo 50 µL de amostras PS, FC e miracídios, e mais 50 µL de PBS 1X (pH7).

A oxigenação foi realizada nas amostras contendo 50 µL de soluções PS, FC e miracídios e 50 µL de PBS 1X, segundos antes da adição da solução de luminol, por 10 ciclos de aspiração/ejeção com auxílio de seringa de insulina.

Como controles positivos, foram utilizadas alíquotas contendo soluções PS, FC e miracídios, como controle negativo foi utilizado PBS 1X.

1.6.5. Estimativa da massa molecular

De forma a analisar a massa molecular do “composto” responsável pela emissão de luz, 500 µl da solução PS e da suspensão contendo miracídios foram ultrafiltradas em membranas com corte de 3 kDa e 10 kDa (Amicon® Ultra), a 345 x g em microcentrífuga, por 30 min. Os ultrafiltrados foram fracionados em triplicatas de 100 µL. O material retido na membrana de 10 kDa foi novamente centrifugado, após a adição PBS 1X, e o líquido final retido na membrana foi removido e aliquoteado em triplicatas 100 µL.

Como controles positivos, foram utilizadas alíquotas contendo amostras não fracionadas de PS e miracídios, e como controle negativo foi utilizado PBS 1X.

1.7. Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

Até o momento não existem relatos sobre a existência de metais em miracídios. Para responder a esta pergunta, parte dos ovos obtidos de fígados de camundongos (vide item 4,1) foram colocados em garrafa padronizada (Figura 5) com água destilada, e exposta à luz em câmara a 27 °C por 1h, para a eclosão dos miracídios. Os miracídios coletados (n=10.000) foram armazenados em tubo de 15 ml com água destilada e congelados a -20 °C até sua utilização.

Com objetivo de verificar se a porção solúvel (PS) dos miracídios também continha metais, 500 µl da mesma solução usada nos experimentos descritos no item 4.6.4 foi analisada.

Para a ICP-MS, foi realizada digestão em 500 µL de ácido nítrico 65% e H₂O₂ 29% v/v *overnight* de 10.000 miracídios e 500 µL solução PS separadamente. Após a digestão, cada amostra foi diluída com água ultra pura, em balão volumétrico de 5 mL e analisadas em ICP-MS, modelo 7700, Agilent, Tóquio, JP no Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia (PUCRS).

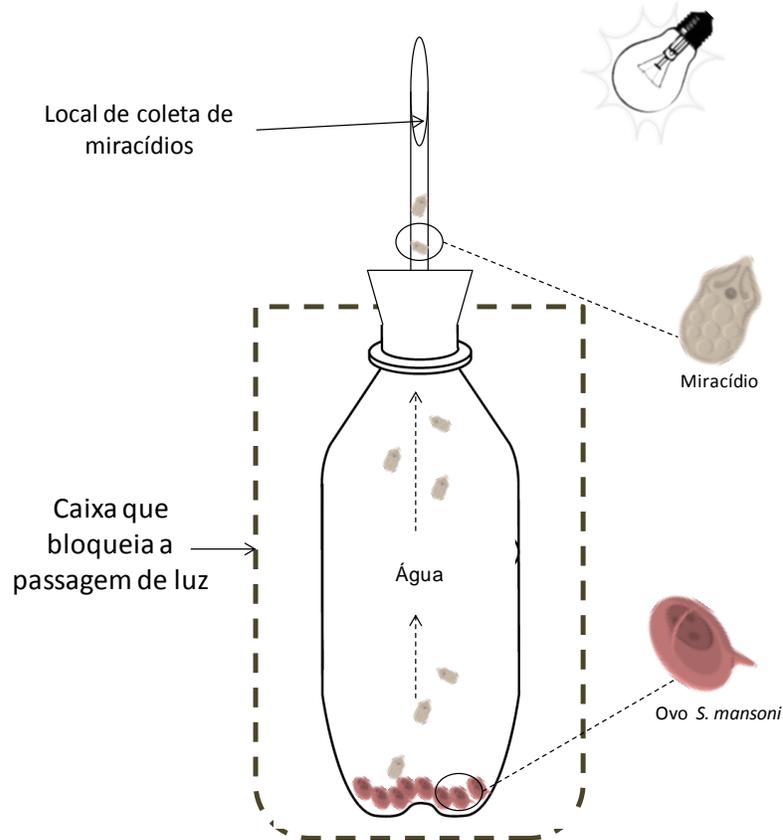


Figura 5: Padronização de garrafa para eclosão e coleta de miracídeos. Representação gráfica da garrafa pet padronizada pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS para coleta de miracídeos.

1.8. Gráficos e análise estatística

Os resultados obtidos em espectrofotômetro foram expressos em gráficos utilizando o *software GraphPad Prism* (versão 5.0). As áreas das curvas obtidas foram submetidas à análise estatística, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação múltipla com teste não paramétrico, com nível de significância de $p < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. Análise de elementos químicos na superfície de ovos de *S. mansoni* confirmam a existência de íon metálicos

A presença de metais da superfície do ovo foi verificada utilizando as técnicas EDS e RBS.

A análise EDS, realizada com a incidência do feixe de elétrons em 25 pontos distintos na superfície dos ovos (Figura 6), mostrou a presença na superfície das diferentes amostras de cobre (Cu), ferro (Fe), níquel (Ni), zinco (Zn) e manganês (Mn), diferindo em quantidade para as amostras Iv-ovos, F-ovos, FH-ovos, porém mostrando uma tendência para maiores quantidades na amostra FH-ovos (Figura 7). Quando as medidas das amostras foram comparadas não apresentaram diferenças. Outros elementos como sódio (Na) e cloro (Cl) da solução salina para estabilização, silício (Si) (substrato de deposição) e ouro (Au), que era o elemento de revestimento da amostra, também foram encontrados.

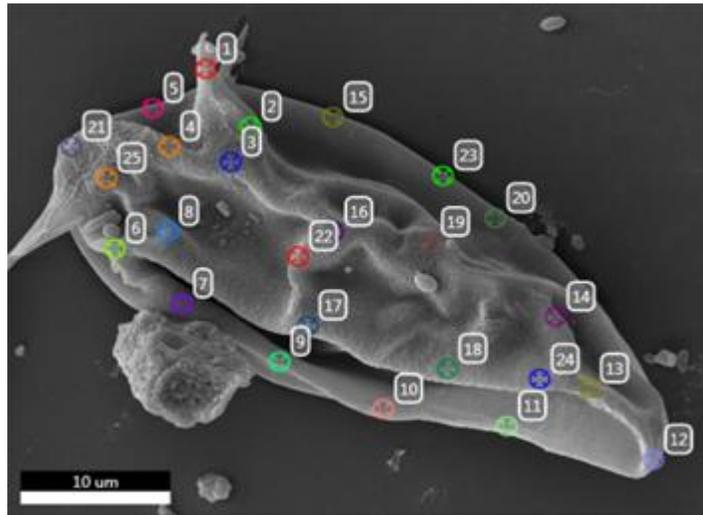


Figura 6: Análise da composição química da superfície do ovo de *S. mansoni* por EDS. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um ovo obtido de fezes humanas (FH - ovos) de *S. mansoni* com 25 pontos marcados para análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

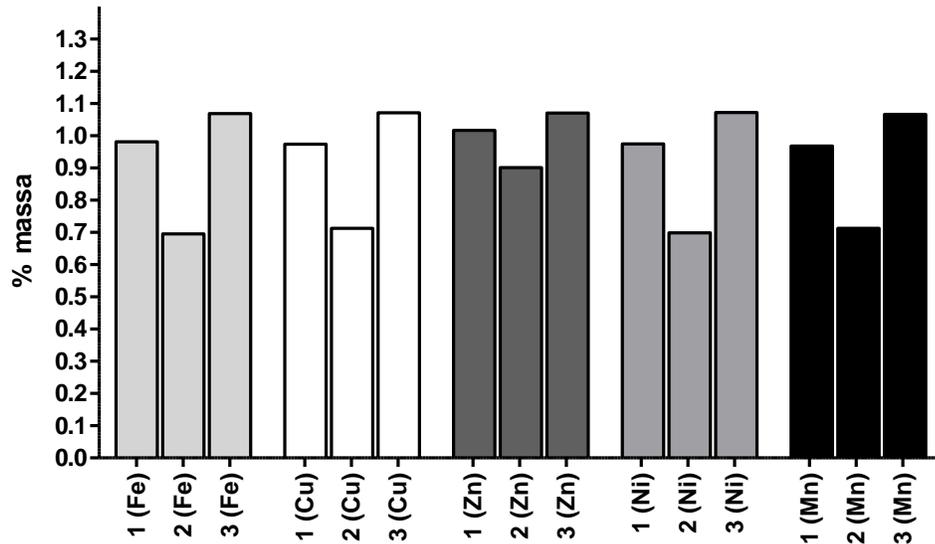


Figura 7: Dados gerados por EDS obtidos de ovos de *S. mansoni*. Médias da análise qualitativa de 25 pontos em triplicatas de ovos. Resultados para os elementos Ni, Zn, Fe, Cu e Mn nas amostras: 1- lv-ovos; 2 - F-ovos; 3 - FH-ovos

As análises por RBS mostram que as três amostras testadas: F-ovos, FH-ovos-PMP e FH-ovos (Figura 8 e Figura 9 A e B) apresentaram Ferro (Fe) em sua superfície. As análises possibilitaram a visualização de um sinal próximo ao canal 520 que corresponde à energia dos íons de He retroespalhados por átomos de carbono (C) das superfícies das amostras. Em torno do canal 760, temos o sinal de retroespalhamento por átomos de oxigênio (O) e canal 1160, o sinal de retroespalhamento por átomos de silício (Si), devido à lamínula. Junto ao canal 1240 temos o sinal de retroespalhamento por átomos de enxofre (S), em seguida, temos o retro espalhamento dos átomos de cálcio (Ca) junto ao canal 1360, o retro espalhamento dos átomos de ferro (Fe) perto do canal 1525 e o de bário (Ba) em 1790. Finalmente, temos retro espalhamento por átomos que faziam parte da solução de PBS: Sódio (Na), Fósforo (P), Cloro (Cl) e Potássio (K) próximos aos canais 1000, 1200, 1320 e 1350, respectivamente. A altura relativa entre dois sinais de elementos distintos de um mesmo espectro indica a quantidade relativa entre eles.

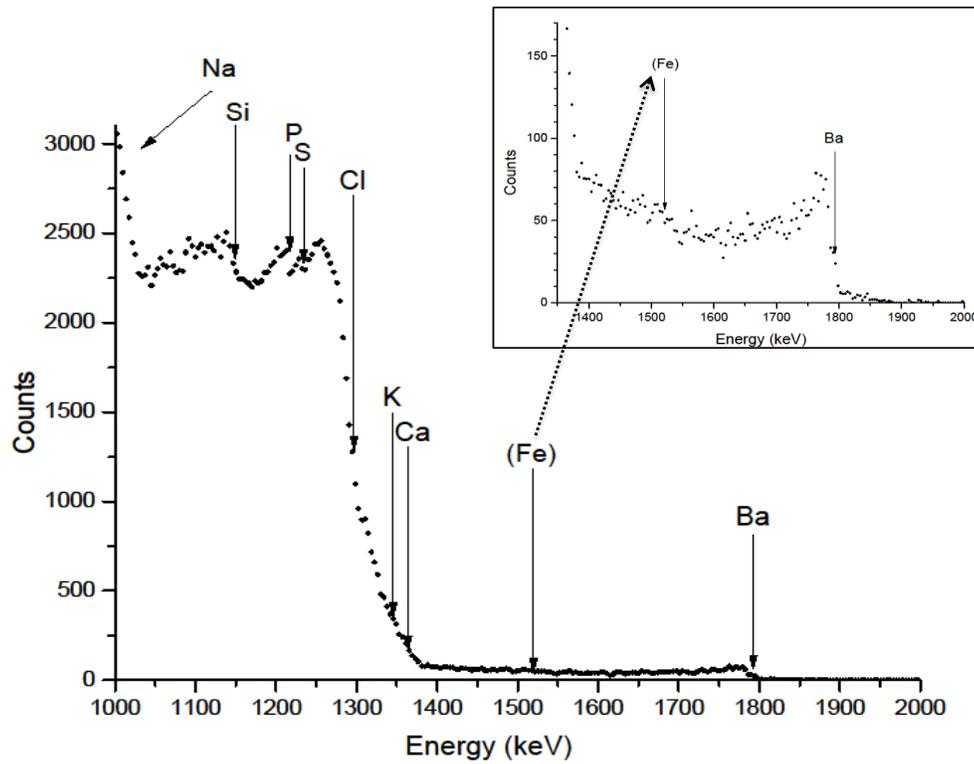


Figura 8: Gráfico gerado pela análise de RBS, demonstrando retroespalhamento dos átomos de ferro (Fe) perto do canal 1525 em amostra contendo ovos obtidos de fígado de camundongo (F - ovos). O pico indica pequena quantidade de ferro.

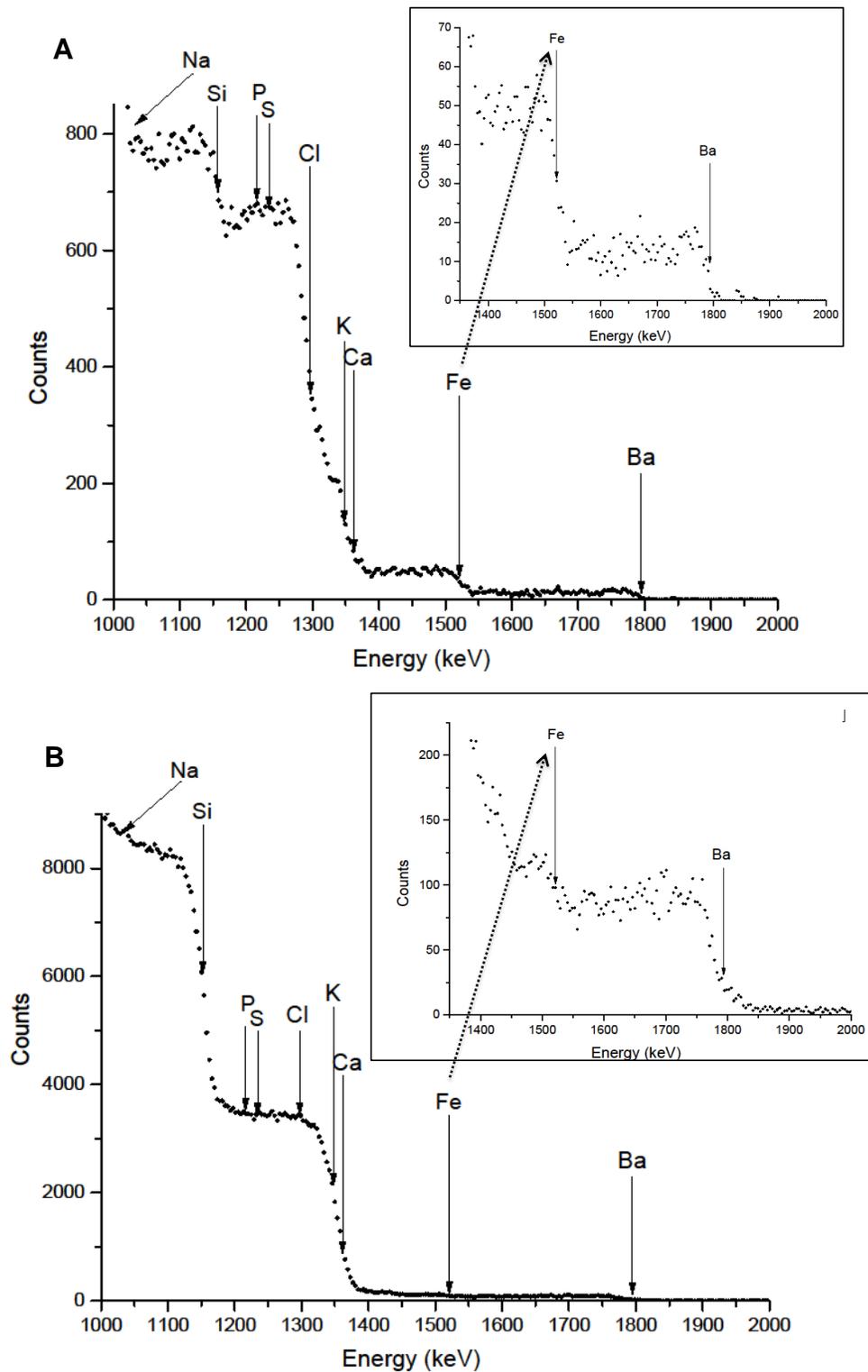


Figura 9: Gráficos gerados pela análise de RBS demonstram retroespalhamento dos átomos de ferro (Fe) perto do canal 1525: A- FH-ovos-PMP com pico indicando grande quantidade de ferro, devido à presença de partículas paramagnéticas na superfície dos ovos; B- FH-ovos com pico indicando ferro.

2.2. Varredura de absorbância no ultravioleta

Dados obtidos pela varredura de absorbância no ultravioleta (UV), de amostras de PS, FC e miracídios indicaram leituras em torno de 260-280 nm (Figura 10), característica de aminoácidos aromáticos em proteínas, como triptofano, fenilalanina e tirosina, nessa ordem de intensidade. Leituras em comprimentos de onda em torno de 210-220 indicam duplas ligações, como ocorre na ligação peptídica, por exemplo.

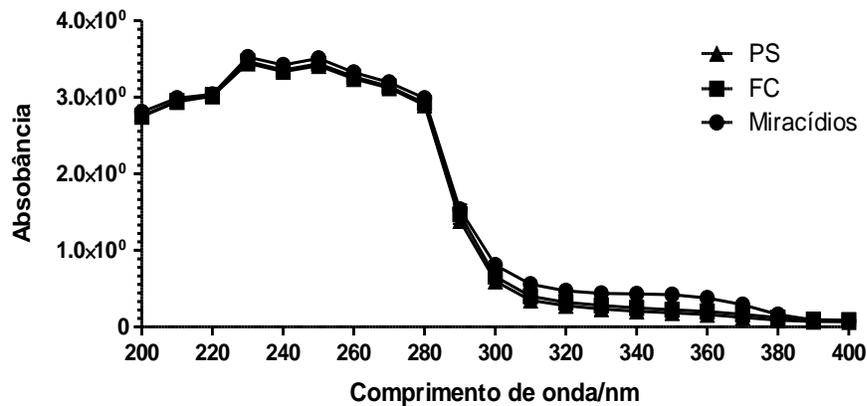


Figura 10: Pico obtido em Varredura de absorbância (UV) indica presença de proteínas. Varredura de absorbância corresponde a um comprimento de onda de 200 nm a 400 nm das amostras contendo fragmentos de cascas de ovos de *S. mansoni* (FC), porção solúvel (PS) e miracídios.

2.3. Análise de quimiluminescência das amostras testadas

As diferentes amostras porção solúvel (PS), fragmentos de casca (FC) de ovos, e miracídios, apresentam curvas de quimiluminescência diferenciadas que se mantêm ao longo de 5 min, apresentando pico de luminescência rápido no primeiro intervalo de registro (Figura 11 A). A amostra contendo miracídios apresentou luminescência superior, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), detectável mesmo a quantidade mais baixa de miracídios por μL ($0,25 \text{ Un}/\mu\text{L}$) (Figura 11 B).

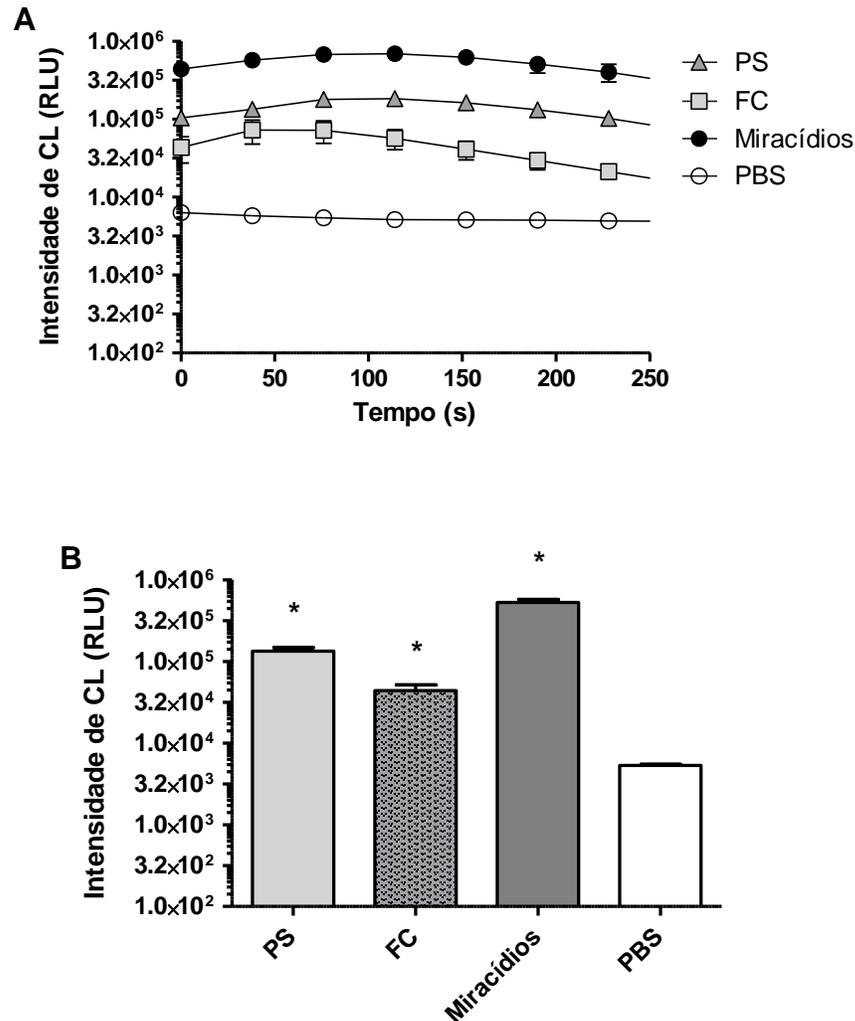


Figura 11: Comparação de quimiluminescência (CL) entre porção solúvel (PS), fragmentos de cascas (FC), e miracídeos. **A-** Amostras apresentando curvas de quimiluminescência diferenciadas mantidas ao longo de 5 minutos. **B-** Gráfico demonstrando área sob a curva das soluções. Porção contendo miracídeos (0,25Un/ μ L) apresentou maior quimiluminescência. Todas as amostras apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle PBS 1X ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.

2.4. Inibição de quimiluminescência por agentes redutores

Os resultados obtidos tratando-se as amostras com Ditiotreitól (DTT), um forte agente redutor, evidenciaram que o(s) composto(s) que aumenta (m) a luminescência

nos ovos de *S. mansoni* e nos miracídios é sensível à oxidoredução. Quando os grupos contendo o agente redutor DTT em diferentes concentrações foram analisados estatisticamente, apenas as amostras PS e FC contendo 50 mM diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação aos seus controles (Figura 12). Já para os miracídios, observou-se que ambas as concentrações de DTT testadas (20 e 50 mM) provocaram inibição da luminescência.

O 2-Mercaptoetanol, um agente redutor mais fraco que o ditiotreitolo, não foi capaz de inibir a quimiluminescência em nenhuma das amostras testadas (Figura 13).

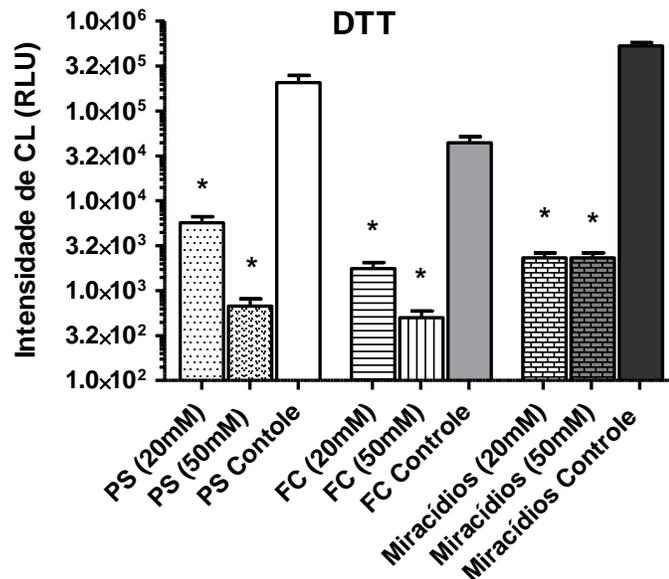


Figura 12: Efeito do agente redutor Ditiotreitolo (DTT), na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. O redutor nas diluições de 20 mM e 50 mM foi pré-incubado com as amostras por 2 horas a temperatura ambiente, antes da adição de luminol. Quando as amostras foram comparadas com seus controles, todas tratadas com DTT (20 mM e 50 mM) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.

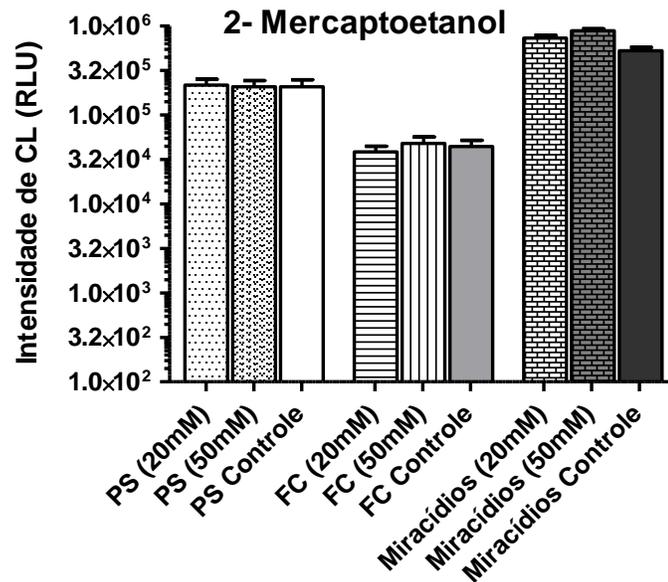


Figura 13: Efeito de agente redutor 2-Mercaptoetanol, na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. O redutor nas diluições de 20 mM e 50 mM foi pré-incubado com as amostras por 2 horas a temperatura ambiente, antes da adição de luminol. Quando as amostras foram comparadas com seus controles não apresentaram diferenças significativas. Comprimento de onda de 431 nm.

2.5. Influência de metais na quimiluminescência

Os resultados obtidos com na presença de EDTA e EGTA, agentes quelantes específicos para Na^+ e Ca^{2+} , demonstraram não haver influência destes na quimiluminescência, indicando que o(s) composto(s) não requer (em) íons Na^+ (EDTA) ou Ca^{2+} (EGTA). A análise estatística das amostras PS, FC e miracídios revelou não haver diferenças significativas, em ambas as concentrações testadas, quando comparado aos seus controles (Figura 14 A e B).

Já o tratamento das amostras com Fenantrolina a 50 mM, um quelante de metais pesados, reduziu a quimiluminescência em todas as amostras testadas. Na concentração mais baixa, 20 mM, a Fenantrolina inibiu a quimiluminescência somente dos miracídios (Figura 15).

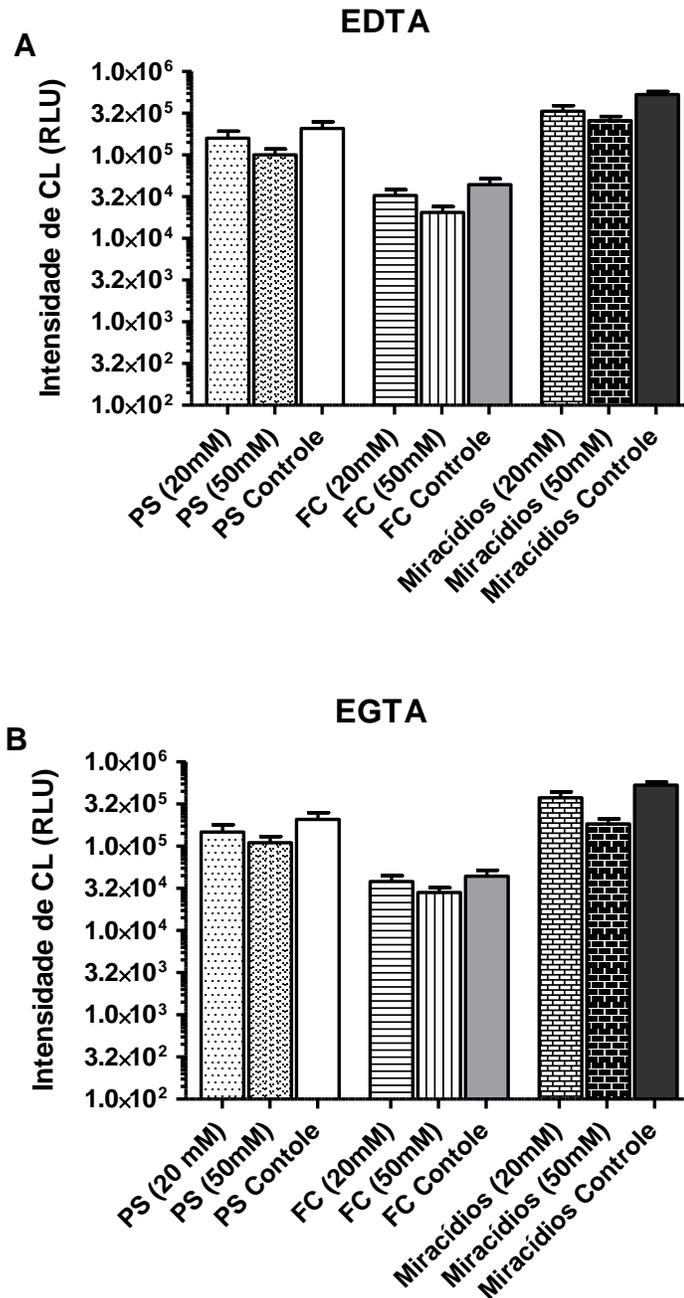


Figura 14: Efeito do uso de quelantes, EDTA e EGTA, na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. Os quelantes, nas concentrações de 20 mM e 50 mM, foram pré-incubadas por 2 h a temperatura ambiente com as amostras de porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios, antes da adição de luminol. **A-** EDTA; **B-** EDTA. Quando as amostras foram comparadas com seus controles não apresentaram diferenças significativas. Comprimento de onda de 431 nm.

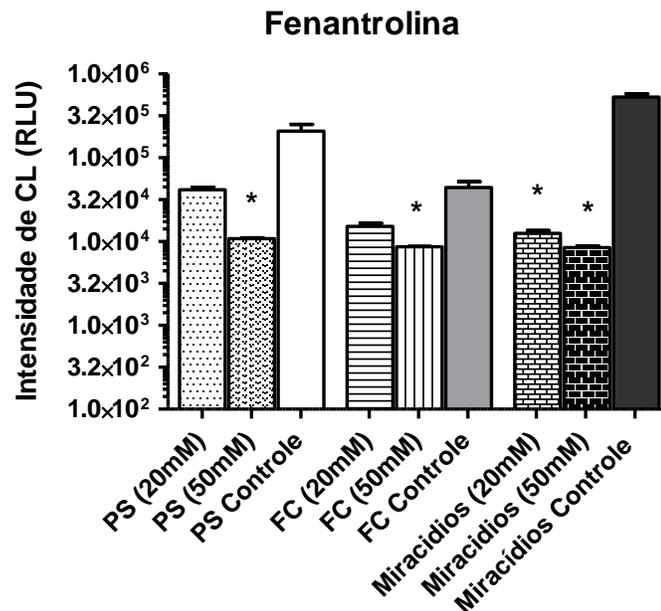


Figura 15: Efeito do quelante Fenantrolina, na quimiluminescência de amostras da porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios. O quelante, nas concentrações de 20 mM e 50 mM, foi pré-incubadas por 2 h a temperatura ambiente com as amostras de porção solúvel (PS) e fragmentos de cascas (FC) de ovos, e miracídios, antes da adição de luminol. Apenas as amostras PS, FC 50 mM e miracídios 20 e 50 mM, apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos seus controles ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.

2.6. Efeito de oxidação e alta temperatura na quimiluminescência

Os resultados obtidos na Figura 12 indicaram que o(s) composto(s) responsável(éis) pela quimiluminescência necessita(m) estar em um estado oxidado, que é revertido na presença de ditioneitol (DTT). Para investigar se a quimiluminescência poderia ser potenciada por oxidação adicional, ou se seria inibida por excesso de oxidação, aumentou-se a oxigenação das amostras PS, FC e miracídios, por 10 ciclos de aspiração/ejeção das soluções em uma seringa. A comparação das amostras revelou que não houve diferença significativa em relação aos controles (Figura 16 A), demonstrando que o(s) composto(s) responsável(éis) já encontrava(m) plenamente oxidado(s)

Quando as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min, e os resultados comparados com controles não aquecidos, não foi possível verificar diferenças

significativas entre eles, demonstrando que o(s) composto(s) é (são) termoestável(éis) (Figura 16 B).

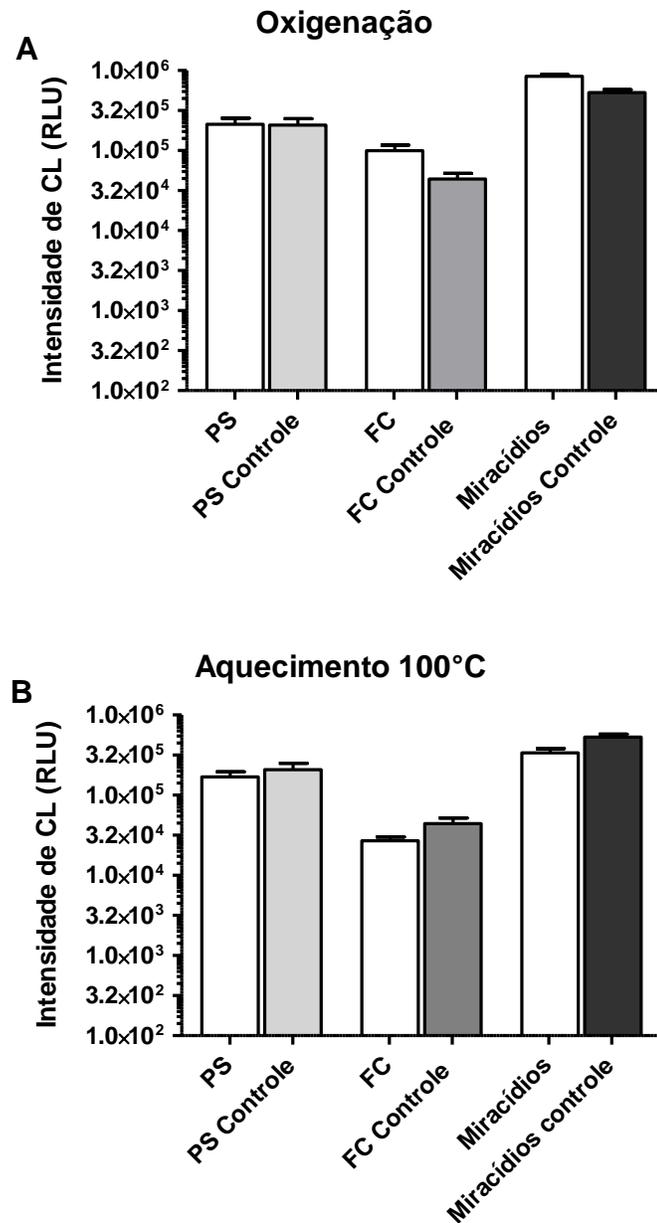


Figura 16: Efeito da oxidação e da alta temperatura na quimiluminescência.

A- Oxigenação induzida por 10 ciclos de aspiração/ejeção com seringa de Insulina em amostras PS, FC e miracídios. **B-** Aquecimento a 100°C por 5 minutos de amostras PS, FC e miracídios. Como controles positivos foram utilizados PS, FC e miracídios não tratados. Quando ambas as amostras foram comparadas com seus controles não apresentaram diferenças significativas. Comprimento de onda de 431 nm.

2.7. Estimativa da massa molecular

Os resultados obtidos com ultrafiltração da amostra PS em membranas porosas com corte de 3 kDa e de 10 kDa revelou que o composto ou compostos quimiluminescente(s) existente(s) tanto porção lisada dos ovos (PS) como nos miracídios, possui(em) massa molecular menor que 3 kDa (Figura 17 A e B).

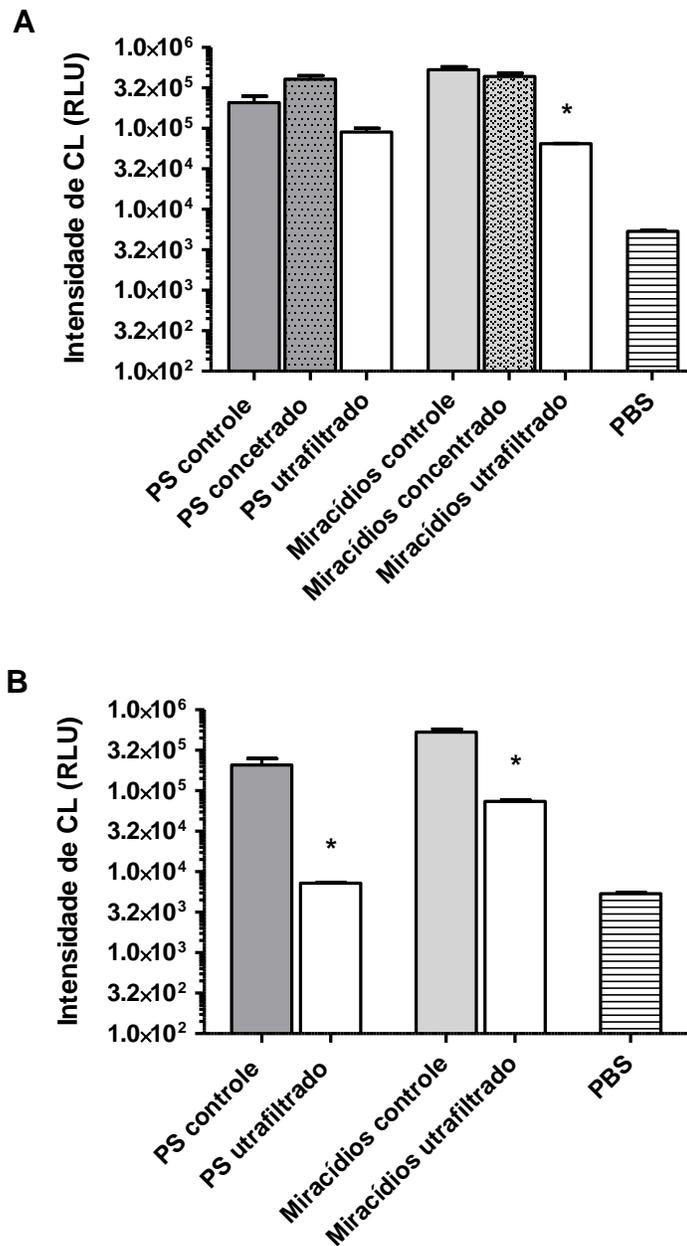


Figura 17: Estimativa da massa molecular por ultrafiltração. **A-** Quimiluminescência obtida em amostras PS e miracídios após ultrafiltração em membrana de 10 kDa. **B-** Quimiluminescência obtida em amostras PS e miracídios após ultrafiltração em membrana de 3 kDa. “Concentrado” se refere ao material retido nas membranas, “ultrafiltrado” se refere ao material que passou pelos poros das membranas. Das amostras testadas, apenas o ultrafiltrado de miracídios (membrana de 10 kDa e 3 kDa) e ultrafiltrado de PS (membrana de 3 kDa) apresentaram diferenças significativas quando comparadas com os seus controles ($p < 0,05$). Comprimento de onda de 431 nm.

2.8. Existência de metais nas amostras contendo miracídios e na porção PS dos ovos

As amostras analisadas em ICP-MS revelaram a existência de metais como Mg, Ca, Fe, Ni, Cu e Zn em miracídios e Mg e Ca na porção PS. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Análise de metais por ICP-MS de 10.000 miracídios e porção PS

Elemento	Mg ($\mu\text{g}/10\text{k}$)	Ca ($\mu\text{g}/10\text{k}$)	Fe ($\mu\text{g}/10\text{k}$)	Ni ($\mu\text{g}/10\text{k}$)	Cu ($\mu\text{g}/10\text{k}$)	Zn ($\mu\text{g}/10\text{k}$)
Miracídios	0,34	1,13	0,49	0,02	0,03	0,15
PS	65,0	671,0	-	-	-	-

$\mu\text{g}/10\text{K}$: microgramas por 10.000 miracídios

$\mu\text{g}/\text{L}$: microgramas por Litro da amostra

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Mesmo após a otimização da metodologia Helmitex pelo uso da ninidrina, a dificuldade para a entrega do resultado diagnóstico do método ainda depende da varredura de todo sedimento final de uma amostra, independentemente de esta ser negativa ou positiva. Esta leitura ainda precisa ser realizada por um profissional treinado na visualização direta de ovos.

Entre 2003 e 2006 entre inúmeros experimentos realizados para estabelecer a prova de conceito do Helmitex[®], um em especial visava comparar três partículas paramagnéticas com diferentes moléculas superficiais. Com ótimos resultados obtidos na utilização de partículas cobertas com estreptavidina, iniciaram-se no laboratório de parasitologia os primeiros testes que envolviam quimiluminescência, utilizando incubação de ovos de *S. mansoni* com peroxidase biotinilada e a revelação com luminol. Passados sete anos dos experimentos iniciais e com o surgimento de artigos que revelaram a existência de cobre (Cu) (Mathieson e Wilson, 2010; DeWalick *et al.*, 2011) e de ferro (Fe) (Kral *et al.*, 2013) em ovos de *S. mansoni*, a ideia de revelar a presença dos ovos por quimiluminescência voltou a ser testada com a utilização direta de uma solução de luminol.

As primeiras experimentações revelaram que ovos de *S. mansoni* em contato com solução contendo Luminol-H₂O₂ emitiam luz, e que esta luz seria passível de quantificação. Além, evidenciaram também diferenças na emissão de luz entre ovos obtidos de fígado de camundongos, cultivo *in vitro* e fezes humanas. Este resultado mostrou que o fenômeno de quimiluminescência poderia também estar relacionado a moléculas biológicas, incluindo grupos protéticos ativos para reações redox (Lindley, 1996; Wilson e Schiffrin, 1996), alguns já descritos nas cascas de ovos e miracídios como proteína dismutase, tioredoxina peroxidase (DeWalick *et al.*, 2011), tioredoxina, superóxido dismutase, peroxidase dependente de ferro (Fe) (Mathieson e Wilson, 2010). Uma hipótese para explicar as diferenças na emissão de luz é que estes compostos poderiam estar presentes em maior ou menor quantidade durante as diferentes etapas de maturação dos ovos (Jurberg *et al.*, 2009). Este achado também

revelou que ovos fígado de camundongos, cultivo *in vitro* e fezes humanas não são iguais em sua composição biológica.

Com o delineamento dos experimentos e resultados que demonstravam maior quimiluminescência em ovos de fezes humanas após adição de partículas paramagnéticas que contém óxido de ferro (Fe), o passo seguinte para utilização da nova metodologia em sedimentos humanos revelou que apenas 100 µL retirados do sedimento final Helmintex seriam suficientes para determinar a positividade de uma amostra, para uma leitura de 5 min em espectrofotômetro. A leitura realizada em placas de polistireno opaco de 96 poços também possibilitou avaliar mais de uma amostra por vez (1 até 8 amostras), revelando rapidamente amostras positivas, e eliminando as negativas, tornando-se especialmente útil em trabalhos de campo.

O desenvolvimento da metodologia Helmintex[®] teve como finalidade a detecção de ovos de *S. mansoni*, por este motivo toda estrutura da metodologia está baseada na eliminação de detritos e seleção de ovos com diâmetros superiores a 45 µm, devido especificamente a abertura da última peneira de tamisação. Os ovos de *Ascaris lumbricoides* foram testados quanto à reatividade de quimiluminescência como controles de especificidade, pois os ovos com diâmetro superior a 45 µm são retidos juntamente com ovos de *S. mansoni* na etapa final de peneiramento. Foi demonstrado que as suspensões de ovos de *A. lumbricoides* superiores a 25 ovos/100 µL podem produzir um pico de quimiluminescência acima do ponto de corte para a detecção de *S. mansoni*. Esta observação preliminar merece novas investigações visando melhorar a especificidade do diagnóstico da esquistossomose pelo procedimento Helmintex e quimiluminescência, e também explorar a utilidade da reação quimiluminescência para detectar outras infecções helmínticas.

A extensa busca pelos composto(s) responsável(is) pela quimiluminescência em ovos de *S. mansoni* apresentou como um obstáculo significativo, a dificuldade na obtenção de grandes quantidades de ovos oriundos de fezes humanas. Mesmo assim, os experimentos realizados pelas técnicas de EDS e RBS, nas quais foi possível analisar ovos de fezes humanas, revelaram a existência de ferro (Fe), na superfície de ovos livres de partículas paramagnéticas (Figuras 7, 8 e 9).

Os resultados aqui obtidos a partir da sonicação de ovos coletados de fígados e miracídeos após a eclosão natural de ovos de fígado de camundongos, revelaram que todas amostras (PS, FC e miracídeos) apresentam algum tipo de composto(s) quimiluminescente, sendo a maior capacidade de emissão de luz encontrada nas amostras contendo miracídeos (Figuras 11). Os experimentos envolvendo agentes redutores, agentes quelantes, oxigenação e aquecimento das amostras a 100 °C revelaram que o(s) composto(s) responsável(éis) pela quimiluminescência é sensível a oxidoredução (como são as pontes dissulfeto em proteínas), é termoestável, e requer um metal pesado para a emissão de luz. Por ultrafiltração das amostras em membranas com corte de 3 e 10 kDa, determinou-se que o(s) composto(s) quimiluminescente(s) apresenta(m) massa molecular menor que 3 kDa.

Análise por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) revelou a existência de 0,49 µg/10K de ferro, dado inédito que reforça a hipótese inicial deste trabalho e sustenta os achados de maior quimiluminescência nas amostras contendo miracídeos. Por ICP-MS não foi possível detectar ferro (Fe) e cobre (Cu) na porção PS de ovos. As grandes quantidades de magnésio (Mg) e cálcio (Ca) encontradas na porção PS podem estar relacionadas diretamente com o estágio de desenvolvimento dos ovos, já que a eclosão de miracídeos ocorre com o completo desenvolvimento do ovo, enquanto que a porção PS é representativa da composição interna de ovos de fígado, que estão em estágios de desenvolvimento diversos. Este fato justificaria as diferenças encontradas na emissão de quimiluminescência das amostras PS (contendo o lisado de 0,5 Un/µL) e miracídeos (contendo 0,25 Un/µL).

Apesar da baixa massa molecular estimada por ultrafiltração, ainda é cedo para descartar que os compostos quimiluminescentes possam ser ou derivar de proteínas existentes em ovos e miracídeos, como proteína superóxido dismutase (Mathieson e Wilson, 2010; DeWalick *et al.*, 2011), que contem Cu-Zn (Protásio *et al.*, 2012 ou alguma proteína contendo heme, como peroxidases (Mathieson e Wilson, 2010; DeWalick *et al.*, 2011), lembrando que peroxidases possuem elevada capacidade de oxidação e em contato com uma solução de luminol emitem forte quimiluminescência (Lindley, 1996; Wilson e Schiffrin, 1996).

Portanto, os resultados relatados neste capítulo revelaram um modo inovador de detectar ovos de *S. mansoni* através de quimiluminescência, no sedimento final do método Helmintex, com capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas, quando analisado apenas 100 μ L do sedimento final, tornando-se especialmente atraente em estudos de campo com centenas de amostras.

Em conclusão, estes resultados demonstram que a quimiluminescência permite a detecção de ovos em sedimentos fecais com alta sensibilidade, podendo ser utilizada na etapa de detecção de outros métodos de concentração. Esta inovação contribuirá para os esforços de eliminação da esquistossomose, potencialmente também das infecções por outros helmintos, e para otimização da avaliação comparativa de métodos diagnósticos moleculares.

CAPÍTULO III

Passagem de ovos de *Schistosoma mansoni* pela parede do intestino de camundongos.

1. INTRODUÇÃO

Para a postura de ovos, as fêmeas de *S. mansoni* migram até o sistema venoso mesentérico inferior, e a partir daí modulam os mecanismos protetores do hospedeiro para que a passagem dos ovos pela parede intestinal seja facilitada (Schwartz e Fallon, 2018). Para chegar à luz intestinal, os ovos necessitam vencer a barreira endotelial, membrana basal das veias e o epitélio intestinal. Inicialmente, este processo depende da resposta imune do hospedeiro, e requer respostas de linfócitos T CD4⁺ T-helper 2 (Th2) (Doenhoff *et al.*, 1978; Cheever *et al.*, 1993) e subsequente a ativação de macrófagos intestinais (Hebert *et al.*, 2004), mas é provável que mecanismos adicionais estejam envolvidos (DeWalick *et al.*, 2014). O tempo necessário para esta transição coincide com a viabilidade do ovo, cerca de três semanas (Jourdane e Théron, 1987). Assim, o ovo é um organismo biologicamente ativo e com total capacidade de interação com o hospedeiro (Schwartz e Fallon, 2018).

Embora o processo de excreção nas fezes de ovos de *S. mansoni* ainda permaneça pouco conhecido até o momento, em uma revisão recente, Schwartz e Fallon (2018) relatam que esta passagem pode ser dividida em quatro estágios: I- Liberação do ovo na corrente sanguínea e adesão ao endotélio; II- Formação de granuloma imune-dependente; III - Transição dos ovos entre o endotélio e o epitélio; IV- Liberação do ovo no lúmen intestinal (Schwartz e Fallon, 2018).

Um fato importante para ser lembrado é que ovos de *S. mansoni* têm uma estrutura rígida de proteínas reticuladas e, portanto, não podem ser impulsionados com base na movimentação do miracídio (DeWalick *et al.*, 2012). Mesmo assim, a hipótese mais antiga retratava que a migração até o lúmen intestinal implicaria a participação do espículo (Jourdane e Théron, 1987). No entanto, a função do espículo ainda é incerta, mas ainda não se descartou a possibilidade que este possa facilitar a ligação do ovo ao endotélio, causando danos celulares a este (Schwartz e Fallon, 2018). Lenzi e colaboradores em 1987, com base em modelos murinos de infecção experimental, propôs que a passagem dos ovos pela parede intestinal seria dependente de eusínófilos, que danificariam a membrana basal do epitélio, tornando-a penetrável para os ovos, e assim, os ovos seriam passivamente expelidos pelo peristaltismo intestinal.

Outros autores afirmaram que a passagem dos ovos pelos vasos sanguíneos e paredes intestinais seria facilitada por enzimas proteolíticas produzidas pelo miracídio (Kloetzi, 1967; Gryseels *et al.*, 2006), uma vez que a passagem dos ovos é coordenada para coincidir com o completo desenvolvimento dos miracídios (Pellegrino *et al.*, 1962). A teoria de secreção de proteínas por ovos de *S. mansoni* data de 1954, proposta como sendo uma fonte de antígenos para sorologia, chamada de “reação de precipitação em torno do ovo” (COP) (Oliver-González, 1954). Neste teste diagnóstico, as proteínas antigênicas secretadas através dos poros da casca do ovo são precipitadas e visualizadas ao microscópio em torno do ovo, após a incubação com soro do hospedeiro contendo anticorpos reativos (Demaree e Hillyer, 1981) Uma proteína secretada que poderia estar envolvida no processo de passagem de ovos pela parede intestinal é a Sm16, uma glicoproteína anti-inflamatória (Cass *et al.*, 2007), que atua como ligante a lipídios, induzindo a apoptose após sua absorção, em células de mamíferos (Holmfeldt *et al.*, 2007). Porém, sua presença só foi confirmada, até o momento, em cercárias (Bickle e Oldridge, 1999) e em vermes adultos de *S. mansoni*, sendo secretada pelo parasita para a penetração cutânea (Rao e Ramaswamy, 2000). Estudos com *S. japonicum*, cuja proteína anti-inflamatória homóloga é chamada de Sj16 (Hu *et al.*, 2009), relatam sua presença em cercárias, ovos, miracídios, esporocistos e esquistossômulo (Gobert *et al.*, 2009).

Experimentos realizados com ovos cultivados *in vitro*, mostraram a aderência de plaquetas sanguíneas à superfície dos ovos (Ngaiza e Doenhoff, 1990; Wu *et al.*, 2007), sugerindo que estas poderiam participar do extravasamento e excreção dos ovos *in vivo* (Ngaiza *et al.*, 1993). DeWalick e colaboradores, em um artigo publicado em 2014, descreveram que ovos de *S. mansoni* atraem proteínas e células hospedeiras, como o fator Von Willebrand e outras proteínas plasmáticas envolvidas na hemostase que se aderem à casca do ovo, promovendo assim a ligação com o endotélio e facilitando a passagem pela parede do vaso sanguíneo (DeWalick *et al.*, 2014). A hipótese que aderência dos ovos ao endotélio dos vasos sanguíneos mesentéricos induz uma resposta inflamatória com formação de granulomas, facilitando assim a passagem dos ovos para o lúmen intestinal foi sustentada por DeFranco *et al.* (2007). Esta formação granulomatosa envolve compostos liberados pelos ovos que podem se ligar às

proteínas da matriz extracelular, e assim gerar inflamação, facilitando a passagem dos ovos através da vasculatura mesentérica até as barreiras endoteliais e mucosas do lúmen intestinal, possibilitando assim a excreção (Cass *et al.*, 2007).

Um estudo publicado em 2013 mostrou que o local da deposição de ovos dentro do trato intestinal influencia a saída eficiente de ovos, sendo que a entrada dos ovos em Placas de Peyer facilitaria a saída para o lúmen intestinal (Turner *et al.*, 2012). No entanto, Schwartz e Fallon (2018) revisaram o assunto e relatam que a excreção de ovos através da parede intestinal só pode ser alcançada na presença de uma inflamação granulomatosa. Contudo, são ainda desconhecidos os detalhes sobre os mecanismos que produzem a saída do ovo (Hams *et al.*, 2013).

Este Capítulo da Tese teve como objetivo investigar o fenômeno da passagem de ovos de *S. mansoni* pela parede intestinal de camundongos, buscando constatar se ocorre fenômeno de agregação (*cluster*) de ovos, já observado em cultivo de vermes de *S. mansoni* e em várias situações do trabalho em laboratório (ANEXO G). Como um braço de estudo molecular da interação ovo-tecidos do hospedeiro, contando também com colaboração com pesquisadores da Queens University, da Irlanda, foi analisada a expressão da proteína Sm16 na superfície dos ovos, durante a sua passagem pela parede intestinal, através de imunofluorescência em cortes histológicos parafinados.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar detalhes da passagem de ovos *S. mansoni* pela parede intestinal

2.1. Objetivos específicos

- Descrever a passagem dos ovos pela parede intestinal do hospedeiro vertebrado (camundongo *Mus musculus*);
- Investigar a hipótese de agregação (*cluster*) dos ovos na passagem pela parede intestinal;
- Verificar a expressão da proteína Sm16 na superfície dos ovos, durante a sua passagem pela parede intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de intestinos de camundongos infectados com *S. mansoni*

O ciclo de *S. mansoni* é mantido pelo laboratório de Parasitologia Biomédica da Faculdade de Ciências da PUCRS, através de passagens por moluscos dos gêneros *Biomphalaria* sp., e camundongos *Mus musculus*, cepa Swiss, com aprovação pelo Comitê de Ética em Animais - PUCRS (CEUA 15/00443).

Após 50º dia de infecção com 150 cerácias, 10 camundongos foram previamente anestesiados com isoflurano 5% para administração de 100 µL de Heparina Sódica 5000 UI/mL (HEPAMAX-S, Brasil) na cavidade peritoneal. Após 10 minutos (min), os animais foram novamente anestesiados com isoflurano 5% e encaminhados para a eutanásia por depressão anestésica de CO₂. Os camundongos foram perfundidos com uma solução contendo 0,13 mol/L de citrato de sódio (Synth, Brasil) para liberação dos vermes adultos, e logo após, procedeu-se a retirada do fígado e do intestino. O experimento foi dividido em dois grupos com cinco amostras de intestino cada:

Grupo 1 - Swiss roll: Os intestinos foram abertos longitudinalmente e após lavagem para retirada das fezes, estes foram fixados por 60 min em formalina 10% e então enrolados com a serosa para o lado interno (Figura 18), segundo a técnica denominada *Swiss roll* (Moolenbeek e Ruitenber, 1981). Logo após, os intestinos foram acomodados em cassetes e acondicionados em formalina 10% até seu processamento, para obtenção de cortes histológicos.

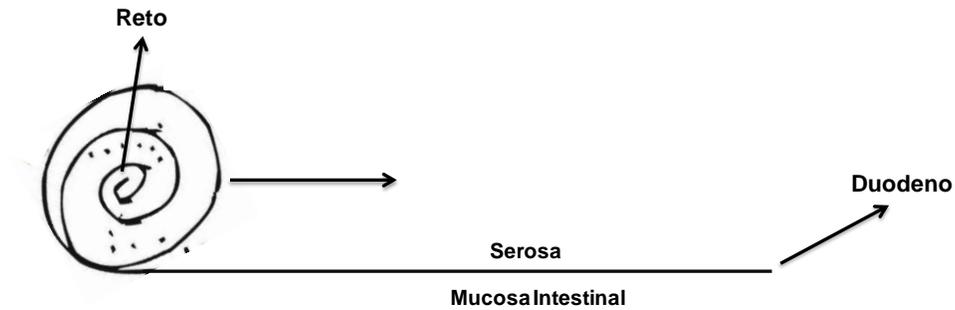


Figura 18: Grupo 1 - Swiss roll. Representação gráfica da técnica *Swiss roll* utilizada para o processamento de 5 intestinos de camundongos, após fixação em formalina 10%.

Grupo 2 - Cortes transversais: Os intestinos ainda contendo fezes em seu interior foram acondicionados em formalina 10% por 24 h. Passadas 24h, os intestinos foram seccionados transversalmente em amostras com 5 mm de espessura provenientes do duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto (Figura 19). Os tecidos foram cuidadosamente acomodados em cassetes e acondicionados em formalina 10% até seu processamento, para obtenção de cortes longitudinais.

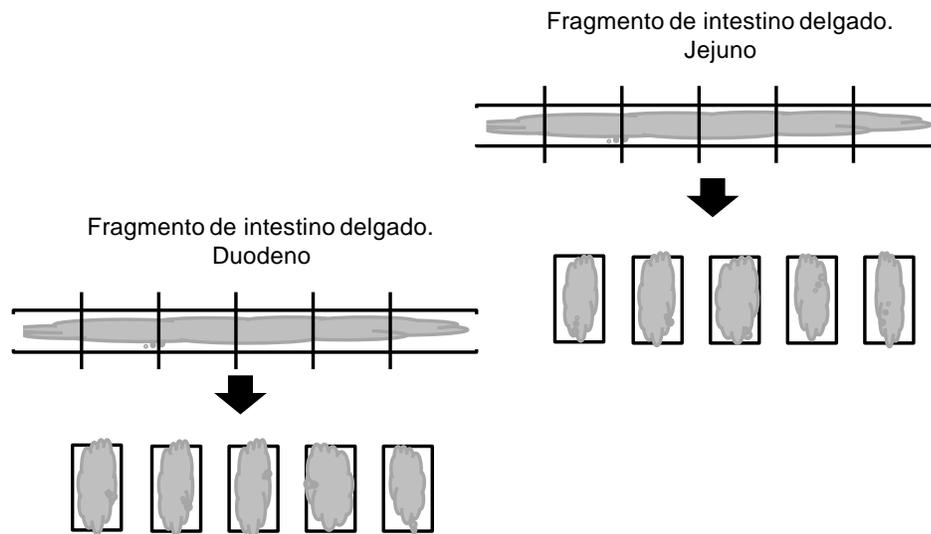


Figura 19: Grupo 2 - Cortes transversais. Representação gráfica das seções transversais de amostras com 5 mm de espessura provenientes do duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto.

3.2. Histologia

Os cassetes foram acomodados em um processador de tecidos do tipo carrossel, onde passaram por desidratação, diafanização e infiltração de parafina. Após o processamento, os tecidos foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo com espessura de 3 μm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), para posterior observação em microscópio.

3.3. Imunofluorescência indireta

Blocos pré-selecionados foram novamente cortados em micrótomo com espessura de 3 μm e dispostos em duas lâminas (um corte positivo e um controle negativo). As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 10 min e após, passaram por processo de desparafinização. A preparação da lâmina foi realizada com lavagens em PBS 1X por 5 min (2x), seguida de incubação com solução de 0,3% de H₂O₂ em metanol (temperatura ambiente) e posterior lavagem com PBS 1X por 5 min (2x). Após as lâminas foram bloqueadas com PBS 1X + 10% BSA e incubadas *overnight* com IgG de coelho (anti-Sm16) como anticorpo primário, diluído em PBS 1X (1:500). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS 1X por 5 min (2x), e a elas foi adicionado 100 μL de Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (Abcam) diluído em PBS 1x (1:300). Passados 4 minutos, as lâminas foram deixadas para secar em local escuro até sua visualização em microscópio confocal. Um segundo corte do mesmo tecido, não incubado *overnight* com IgG de coelho (anti-Sm16), foi usado como controle negativo.

3.4. Registro das imagens

As imagens dos cortes histológicos corados em HE foram fotografadas em microscópio Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), equipado com videocâmera QImaging Retiga 2000R (Surrey, Canadá), e processadas com o programa de imagens Image Pro Plus 6.0 Media Cybernetics, Rockville, EUA.

As imagens de imunofluorescência indireta foram adquiridas em microscópio confocal LSM5 Exciter Zeiss.

4. RESULTADOS

4.1. Passagem dos ovos de *S. mansoni* pela parede intestinal de camundongos

As análises dos cortes histológicos dos Grupos 1 - Swiss roll e Grupo 2- Cortes transversais, revelaram que o fenômeno de passagem dos ovos de *S. mansoni* se dá ao longo de todo o intestino do camundongo. Esta passagem ocorre desde o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) até o intestino grosso (Ceco, cólon e reto) (figuras 20 e 21). O fenômeno de agregação (*cluster*) de ovos foi observado em inúmeros cortes analisados (Figuras 20, 21 e 22).

As visualizações das lâminas coradas em HE por microscopia confocal revelaram a existência de um espaço irregular no entorno do ovo, tanto naqueles que estão passando pela parede intestinal (b), como em ovos que já se encontram em meio às fezes (a) (Figura 22).

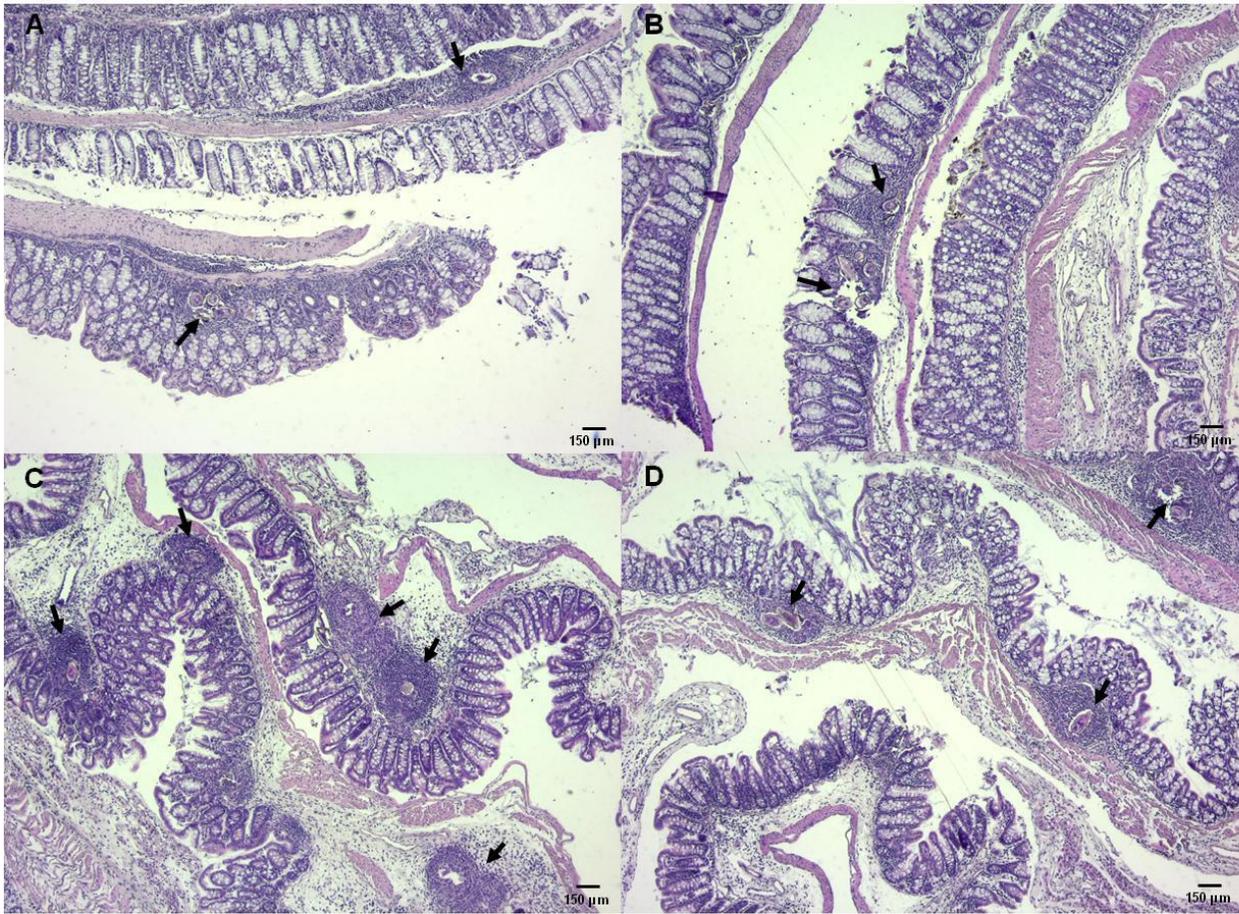


Figura 20: Passagem de ovos de *S. mansoni* se dá ao longo de todo o intestino de camundongos. Grupo 1 - Swiss Roll. Registro em microscópio, aumento 4x, coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Nas imagens as setas indicam granulomas e agregação (*cluster*) de ovos de *S. mansoni*, no intestino delgado (A e B) e no intestino grosso (C e D).

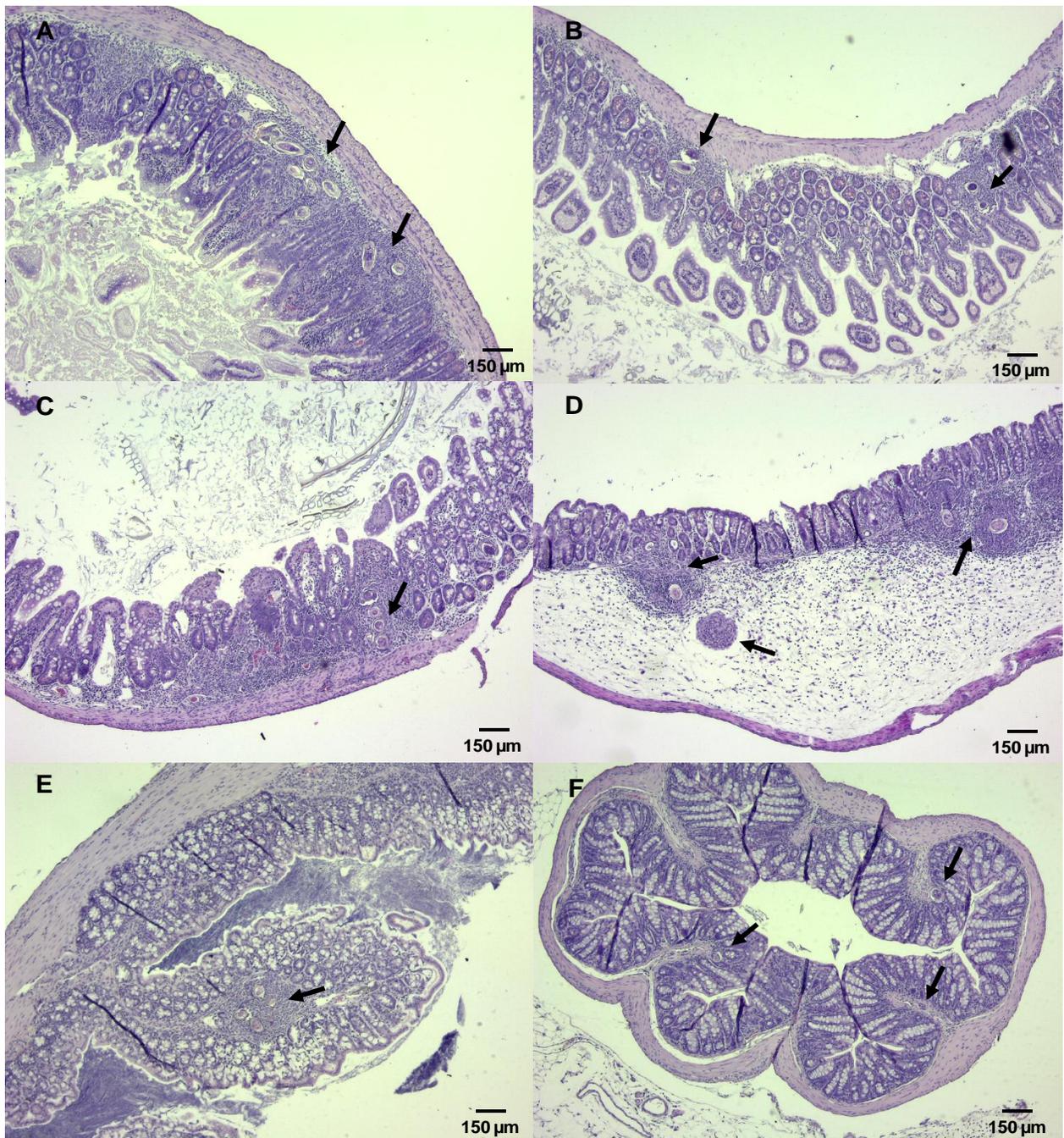


Figura 21: Cortes histológicos revelam fenômeno de agregação (*cluster*) de ovos na parede intestinal. Grupo 2 - Cortes transversais. Registro em microscópio Zeiss Axioskop 40, aumento 4x. **A** - Intestino delgado, porção do duodeno, as setas indicam local com eusíntese aumentada e agregação de mais de oito ovos de *S. manoni* passando por microvilosidades; **B** - Intestino delgado, porção do jejuno, as setas indicam ovos passando por microvilosidades; **C** - Intestino delgado, porção do íleo, setas indicam passagem de ovos em linha e eusíntese alterada; **D** - Intestino grosso, porção do ceco, setas indicam granuloma bem formado contendo ovos, e ovos iniciando passagem pelas microvilosidades intestinais; **E** - Intestino grosso, porção do cólon, a seta indica passagem de mais de cinco ovos por microvilo em região com eusíntese aumentada; **F** - Intestino grosso, porção do reto, a seta indica ovos próximo à camada basal do epitélio.

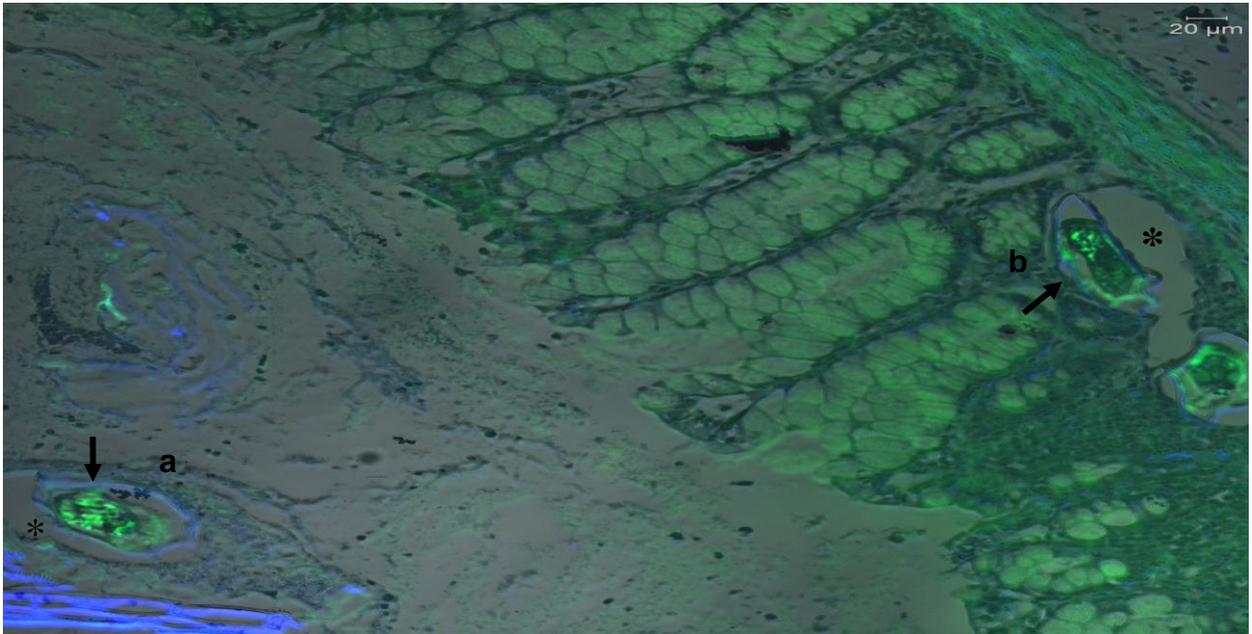


Figura 22: Passagem de ovos de *S. mansoni* pela parede do endotélio intestinal mostrando um espaço irregular em torno dos ovos. Corte transversal de intestino grosso. Imagens registradas por microscopia confocal, com laser no comprimento onda 405 e 488 nm em aumento 20x. As setas indicam ovos que já se encontram no sedimento fecal (**a**) e no momento da passagem pelo endotélio intestinal (**b**). Em ambos, é possível observar um espaço irregular em torno dos ovos (*).

4.2. Secreção de proteína Sm 16 durante passagem pelo endotélio intestinal

A visualização em microscópio confocal das lâminas incubadas com anticorpo primário (Sm16) revelaram maior fluorescência quando comparadas aos seus controles (Figura 23).

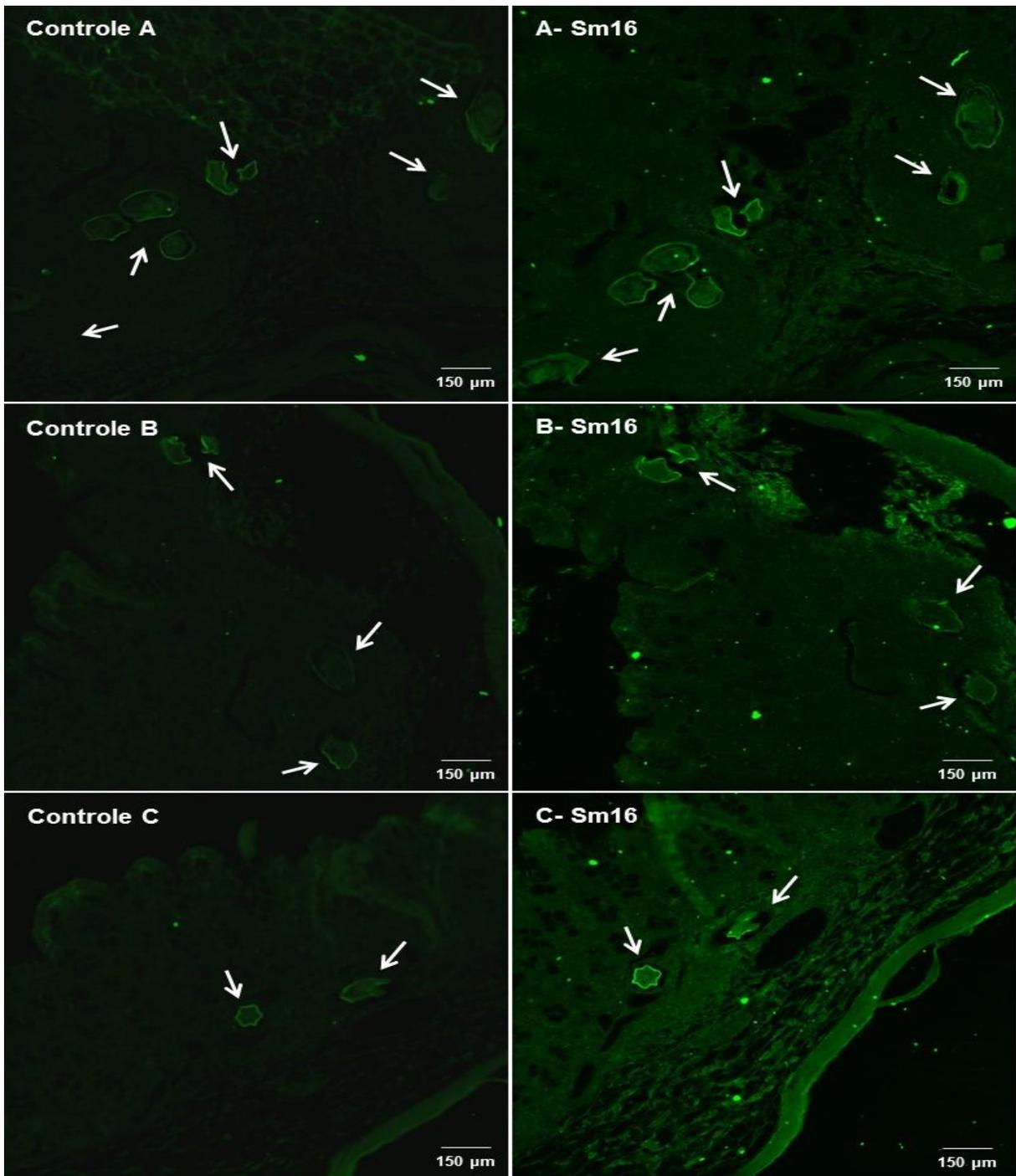


Figura 23: Imunofluorescência indireta retrata secreção da proteína Sm 16 durante passagem de ovos pela parede do endotélio intestinal. Corte transversal de intestino grosso, obtido de camundongo após 50 dias de infecção por *S. mansoni*. Grupos controle (A, B, C) e Sm16 (A, B, C), submetidos à Imunofluorescência indireta, com imagens registradas por microscopia confocal, com laser no comprimento onda 405 e 488 nm. As setas indicam ovos, no momento da passagem pelo endotélio. Registro em aumento 20x.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O entendimento da fisiopatologia da infecção por *S. mansoni* tem avançado nos últimos anos com o uso de camundongos, mesmo que este modelo experimental apresente diferenças na fibrose hepática e patologia, em relação ao que se observa em humanos (Fallon, 2000). No modelo murino, o desenvolvimento de granulomas reflete adequadamente a formação granulomatosa humana. Desta forma camundongos são modelos adequados para estudar a passagem dos ovos pela parede endotelial (Schwartz e Fallon, 2018).

A formação de granuloma ao redor de ovos presos dentro do tecido hepático e intestinal é uma característica marcante da infecção pelo esquistossomo, e a principal causa de patologia nos hospedeiros infectados. No entanto, o granuloma do ovo funciona tanto para o hospedeiro quanto para o parasita (Hams *et al.*, 2013): (a) inflamação granulomatosa intestinal facilita o processo de translocação do ovo para o lúmen gastrointestinal; (b) reduz a translocação bacteriana do intestino para a circulação do hospedeiro, (c) protege os tecidos do hospedeiro de respostas imunes exageradas contra antígenos do ovo, e (d) em última análise beneficia os parasitas adultos, ao favorecer a saída do principal elemento patogênico nesta infecção (Schwartz e Fallon, 2018).

Uma das principais questões trazidas neste Capítulo era o entendimento da passagem dos ovos pela parede do endotélio intestinal, com ênfase no fenômeno de agregação (*cluster*), nunca estudada antes para ovos de *S. mansoni*. Esta hipótese de passagem surgiu com a observação constante do oviposição *in vitro* e inúmeros registros feitos pelo Grupo de Parasitologia (vide ANEXO G). Tal fenômeno, se possível, favoreceria o equilíbrio parasito-hospedeiro.

Já a ideia de investigação da secreção da proteína Sm16 por imunofluorescência indireta em cortes parafinados, até então pioneira, foi guiada por experimentos realizados por um dos nossos colaboradores, Dr. John P. Dalton da Queens University Belfast, Irlanda, que identificou por imunolocalização a proteína Sm16 em ovos de *S. mansoni* após técnica de criomicrotomia em fígados de camundongo.

Nossos resultados até o momento comprovaram a hipótese de passagem de agregados (*cluster*) de ovos pela parede intestinal, como frequentemente registrada em todos os cortes histológicos realizados nos grupos: 1 - Swiss Roll e 2 - Cortes transversais. Também foi observado no modelo de infecção experimental, que a passagem de ovos ocorre ao longo de todo o intestino, do duodeno até o reto. Na microscopia confocal, foi observado um espaço irregular em torno dos ovos que estão passando pela parede intestinal e que se encontram no sedimento fecal. Tal espaço poderia estar relacionado com a secreção de proteínas (enzimas hidrolíticas) pelos ovos de *S. mansoni*, como já relatado (Oliver-González, 1954; Demaree e Hillyer, 1981).

Quando os cortes transversais referentes ao intestino grosso foram submetidos à imunofluorescência indireta para verificação da secreção da proteína Sm16 por ovos durante a passagem pela parede intestinal, foi possível verificar maior fluorescência nos cortes corados com anti-Sm 16, quando comparadas aos controles.

Em conclusão, relatamos pela primeira vez a secreção da proteína Sm16 e a agregação (*cluster*) de ovos de *S. mansoni*, durante a passagem pela parede intestinal de camundongos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo o aprimoramento da metodologia Helmintex[®] para o diagnóstico da esquistossomose mansoni. Com base nos dados apresentados, fica evidente que a otimização do método Helmintex, e sua aplicação em dois grandes estudos de campo, trouxeram à metodologia a certificação de sua sensibilidade, o reconhecimento para sua utilização como método de referência para o diagnóstico da esquistossomose intestinal, e para a avaliação comparativa de outros testes. Ainda relatamos o uso inédito da quimiluminescência na detecção de ovos de *S. mansoni*, trazendo a metodologia Helmintex agilidade no diagnóstico, pela capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas de apenas 100 µL do sedimento final. Tais modificações encontram-se sintetizadas na Figura 24. Além disso, relatamos pela primeira vez a formação de agregados (*cluster*) e a excreção da proteína Sm 16 por ovos de *S. mansoni* durante a passagem pela parede intestinal de camundongos.

Tais dados contribuirão significativamente para a redução da prevalência de infecções de intensidade alta (para menos de 5% até 2020), e eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública (para menos de 1% até 2025), compromisso este, assumidos pelo Ministério da Saúde (Plano Estratégico da Organização Mundial da Saúde 2012-2020).

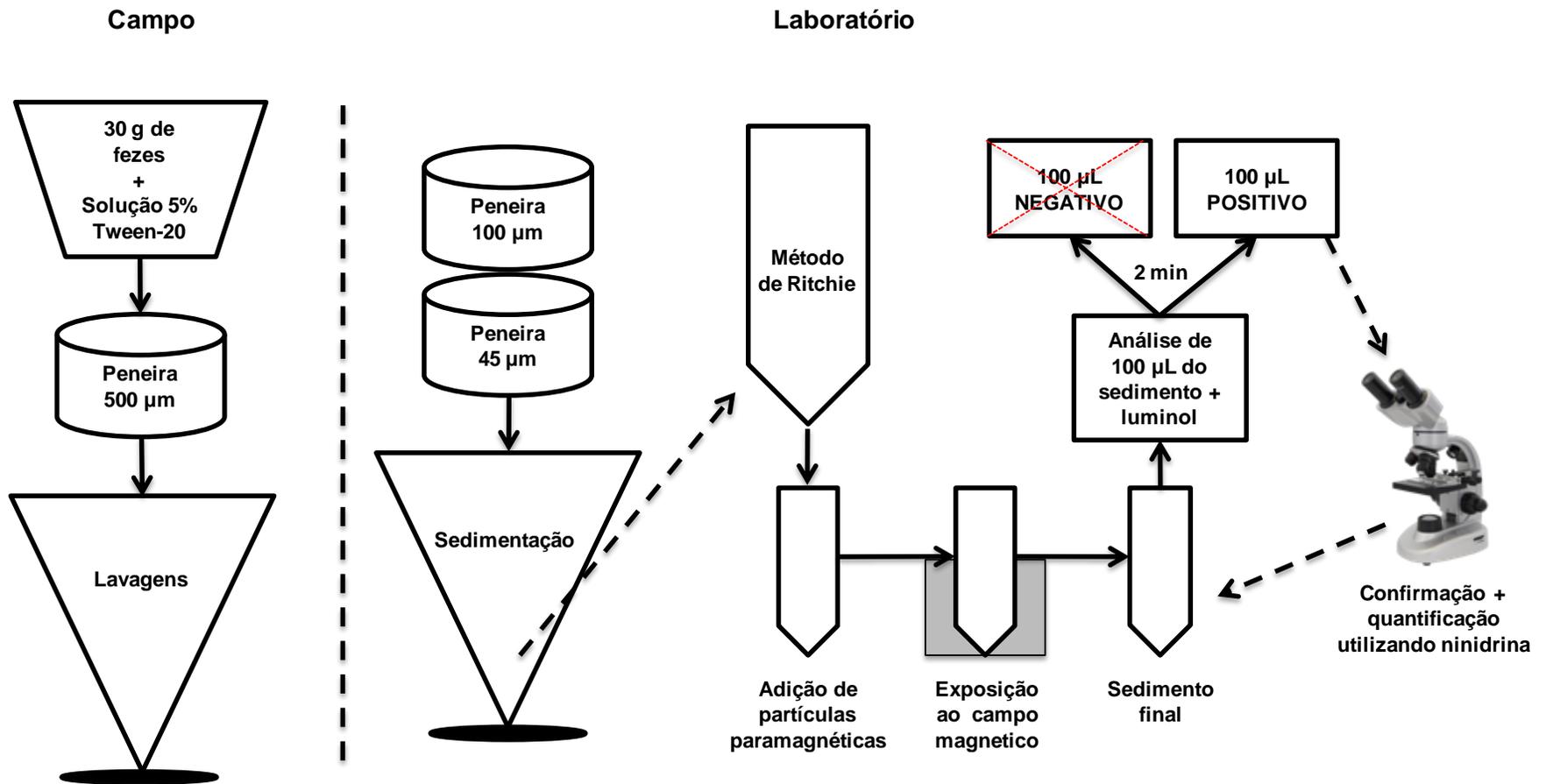


Figura 24: Aprimoramento da metodologia Helmintex. Representação esquemática do aprimoramento da metodologia Helmintex, com a utilização de solução de luminol em apenas 100 µL do sedimento final, para discriminar amostras positivas e negativas, e posterior confirmação da parasitose e quantificação dos ovos, utilizando coloração de ninidrina e visualização em microscopia óptica de todo sedimento final.

PERSPECTIVAS

- Dar continuidade a investigação dos componentes e mecanismos responsáveis pela quimiluminescência em ovos de *S. mansoni* obtidos de fezes humanas com a realização de estudos de proteômica;
- Investigar a reação de quimiluminescência em ovos de outros helmintos;
- Testar a o uso do sistema Luminol - H₂O₂ em amostras de HTX obtidas no município de Indiaroba/SE, durante realização do projeto de pesquisa multicêntrico denominado, “Validação de Teste Diagnóstico de Urina POC-CCA (Antígeno Catódico Circulante) para detecção de esquistossomose em áreas de baixa endemicidade”, em abril de 2019;
- Prosseguir com os estudos sobre a expressão da proteína Sm16 na superfície dos ovos, durante a sua passagem pela parede intestinal.

ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), estando vinculado ao projeto “Desenvolvimento de metodologias de vigilância sanitária e diagnóstica da esquistossomose mansônica em focos de baixa endemicidade e verificação da sua aplicabilidade pela rede básica de serviço de saúde”, com a devida aprovação do Comitê de Ética da FAMED e de Ética em Pesquisa da PUCRS (Protocolo 2015-0016) e projeto de “Manutenção do ciclo e produção de antígenos diagnósticos dos helmintos: *Schistosoma mansoni*, *Angistrongylus cantonesis* e *A. Costaricensis*”, registro CEUA 15/00443 (ANEXO B).

REFERÊNCIAS

ABDUL-SALAM, F.; MANSOUR, M. H. Identification and localization of a schistosome-associated fucosyllactose determinant expressed by *Fasciola hepatica*. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 23, n. 2, p. 99-111, 2000. ISSN 0147-9571.

ADAM, Y.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Luminol and isoluminol chemiluminescence reaction catalyzed by synthetic water-soluble metalloporphyrins. **New journal of chemistry**, v. 16, n. 4, p. 525-528, 1992. ISSN 1144-0546.

ALBONICO, M. et al. Comparison of the Kato-Katz thick smear and McMaster egg counting techniques for monitoring drug efficacy against soil-transmitted helminths in schoolchildren on Pemba Island, Tanzania. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 199-201, 2012. ISSN 1878-3503.

ALBRECHT, H.O. Chemiluminescenz des Aminophthalsaure-Hydrazids. **Journal of Physical Chemistry**, v. 136, p.321-30, 1928.

AMIRI, P. et al. Tumour-necrosis factor- α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**, v.356, n. 356, p. 604–607, 1992.

ANDRADE, Z. A.; BINA, J. C. A patologia da forma hepato-esplênica da esquistossomose mansoni em sua forma avançada (estudo de 232 necrópsias completas). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 3, p. 285-305, 1983. ISSN 0074-0276.

ASTHON, P.D. et al. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, v.122, n. Pt 3, p. 329-338, 2001.

BARBOSA, C. S. et al. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, p. 609-616, 1996. ISSN 0034-8910.

BELL, D. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces: with special reference to therapeutic trials. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, n. 4, p. 525, 1963.

BERGQUIST, R. et al. Elimination of schistosomiasis: the tools required. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 158, 2017. ISSN 2049-9957.

BICKLE, Q. D.; OLDRIDGE, J. Characterization of a stage-specific Mr16 000 schistosomular surface glycoprotein antigen of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 100, n. 1, p. 85-94, 1999. ISSN 0166-6851.

BOCKARIE, M. J. et al. Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, n. 1623, p. 20120144, 2013. ISSN 0962-8436.

CABELLO, R et al. Schistosoma mansoni infection and related knowledge among schoolchildren in an endemic area of Minas Gerais, Brazil, prior to educational actions. *Acta Tropica*, v. 164, p. 208-215, 2016.

CALDEIRA, K. et al. Comparison of the Kato-Katz and Helmintex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Paraná, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 690-2, 2012.

CAMPBELL, A. K.; CAMPBELL, A. K. Chemiluminescence: principles and applications in biology and medicine. 1988.

CASAVECHIA, M. T. G. et al. Systematic review and meta-analysis on Schistosoma mansoni infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, p. 1-15, 2018. ISSN 0031-1820.

CASS, C. L. et al. Proteomic analysis of Schistosoma mansoni egg secretions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 155, n. 2, p. 84-93, 2007. ISSN 0166-6851.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CESARI, I. M. et al. Detection of Schistosoma mansoni membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 2, p. 280-286, 2005. ISSN 1556-6811.

CHEEVER, A. W. et al. Biology and pathology of Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum infections in several strains of nude mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 4, p. 496-503, 1993. ISSN 0002-9637.

CHEEVER, A. W. et al. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 9, p. 465-466, 2000. ISSN 0167-5699.

CHEEVER, A. W. et al. Kinetics of egg production and egg excretion by Schistosoma mansoni and S. japonicum in mice infected with a single pair of worms. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 50, n. 3, p. 281-295, 1994. ISSN 0002-9637.

CHEN, X. et al. Follicular helper T cells promote liver pathology in mice during *Schistosoma japonicum* infection. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004097, 2014. ISSN 1553-7374.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta tropica**, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000. ISSN 0001-706X.

CI, Y-X. et al. Chemiluminescence investigation of interaction of metalloporphyrins with nucleic acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 282, p. 695-701, 1993.

CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 6-24, 2011. ISSN 1477-8939.

COLE, G. The metabolism of schistosomes: a review. **International Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 22, p. 319-337, 1973. ISSN 0020-711X.

COLLEY, D.; SECOR, W. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014. ISSN 0141-9838.

COLLEY, D. G. et al. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 63, 2017. ISSN 2049-9957.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014. ISSN 0140-6736.

CORACHAN, M. Schistosomiasis and international travel. **Clinical infectious diseases**, v. 35, n. 4, p. 446-450, 2002. ISSN 1537-6591.

CORDINGLEY, J. Trematode eggshells: novel protein biopolymers. **Parasitology Today**, v. 3, n. 11, p. 341-344, 1987. ISSN 0169-4758.

COULIBALY, J. T. et al. Accuracy of urine circulating cathodic antigen test for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* in preschool-aged children before and after treatment. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2109, 2013. ISSN 1935-2735.

COURA, J. R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000. ISBN 8527718618.

DALTON, J. et al. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 29-32, 1997. ISSN 1469-8161.

DE CLERCQ, D. et al. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections in Office du Niger, Mali.

Tropical Medicine & International Health, v. 2, n. 7, p. 680-685, 1997. ISSN 1360-2276.

DE FRANCO, A., et al. *Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease*. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 80, n. 3, p. 137, 2007.

DE VLAS, S.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. **Parasitology Today**, v. 8, n. 8, p. 274-277, 1992. ISSN 0169-4758.

DeWALICK, S. et al. The proteome of the insoluble *Schistosoma*. **International Journal Parasitology**, v. 4, n. 5, p. 523-32, 2011.

DeWALICK, S. et al. *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 7-13, 2012.

DeWALICK, S. et al. Binding of von Willebrand factor and plasma proteins to the eggshell of *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 263–268, 2014.

DEELDER, A. et al. Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. **Tropical and geographical medicine**, v. 46, n. 4 Spec No, p. 233-238, 1994. ISSN 0041-3232.

DEMAREE, R.; HILLYER, G. V. *Schistosoma* species: transmission electron microscopy of the circumoval immune precipitin reaction on eggs. **Experimental parasitology**, v. 52, n. 1, p. 77-85, 1981. ISSN 0014-4894.

DISCH, J. et al. Daily fluctuation of levels of circulating cathodic antigen in urine of children infected with *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 2, p. 222-225, 1997. ISSN 1878-3503.

DOENHOFF, M. et al. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. **Immunology**, v. 35, n. 5, p. 771, 1978.

DUNNE, D. W.; PEARCE, E. J. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. **Microbes and infection**, v. 1, n. 7, p. 553, 1999. ISSN 1286-4579.

ENK, M. J. et al. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 222-228, 2008. ISSN 0001-706X.

FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology today**, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2000. ISSN 0167-5699.

FAVERO, V. et al. Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. **Experimental parasitology**, v. 177, p. 28-34, 2017. ISSN 0014-4894.

FAVRE, T. C. et al. School-based and community-based actions for scaling-up diagnosis and treatment of schistosomiasis toward its elimination in an endemic area of Brazil. **Acta Tropica**, v. 149, p. 155-162, 2015

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química nova**, 2002. ISSN 0100-4042.

FITZPATRICK, J. M. et al. Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 3, p. 823-835, 2007. ISSN 0892-6638.

FRANCIS, P.S et al. Hypohalites an related oxidants as chemiluminescence reagents: a review. **Luminescence**, v. 19, p. 94-115, 2004.

FORD, J. W.; BLANKESPOOR, H. D. Scanning electron microscopy of the eggs of three human schistosomes. 1979.

GAUGHAN, P. L.; KRASSNER, S. M. Hemin deprivation in culture stages of the hemoflagellate, *Leishmania tarentolae*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 5-IN1, 1971. ISSN 0305-0491.

GLANFIELD, A. et al. A cytochrome b561 with ferric reductase activity from the parasitic blood fluke, *Schistosoma japonicum*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e884, 2010. ISSN 1935-2735.

GOBERT, G. N. et al. Developmental gene expression profiles of the human pathogen *Schistosoma japonicum*. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 128, 2009. ISSN 1471-2164.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian state, Rio Grande do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, 1999. ISSN 0074-0276.

GRAY, D. J. et al. Diagnosis and management of schistosomiasis. **Bmj**, v. 342, p. d2651, 2011. ISSN 0959-8138.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006. ISSN 0140-6736.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 89, 2013. ISSN 1664-3224.

HAY, S. I. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1260-1344, 2017. ISSN 0140-6736.

HERBERT, D.R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, v. 20, p. 623-635, 2004.

HELENIUS, A. et al. [63] Properties of detergents. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.56, 1979. p.734-749. ISBN 0076-6879.

HINRICHSEN, S. **Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1º edição**: Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan 2005.

HOFFMANN, W.A. et al. Sedimentation concentration method in schistosome. **Porto Rico of Public Health**, v. 9 p. 281-298, 1934.

HOGG, K. G. et al. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 6, p. 3563-3571, 2003. ISSN 0019-9567.

HOLMFELDT, P. et al. The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 is a membrane-binding protein that lacks the proposed microtubule-regulatory activity. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 225-234, 2007. ISSN 0166-6851.

HOTEZ, P. J. et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014. ISSN 1935-2735.

HOTEZ, P. J.; KAMATH, A. Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 8, p. e412, 2009. ISSN 1935-2735.

HU, S. et al. Clonagem molecular e expressão de uma proteína anti-inflamatória funcional, Sj16, de *Schistosoma japonicum*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 191–200, 2009.

ISACSSON, U; WETTERMSRK, G. The determination of inorganic chlorine compounds by chemiluminescence reactions. **Analytica Chimica Acta**, v. 83, p. 227–239, 1976.

JONES, M. K. et al. Tracking the fate of iron in early development of human blood flukes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 9, p. 1646-1658, 2007. ISSN 1357-2725.

JORDAN, P. From Katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology and control of bilharzia. **Acta tropica**, v. 77, n. 1, p. 9-40, 2000. ISSN 0001-706X.

JOURDANE, J.; THÉRON, A. Larval development: eggs to cercariae. **The biology of schistosomes. From genes to latrines. London: Academic Press Ltd**, p. 83-106, 1987.

JURBERG, A. D. et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. **Development genes and evolution**, v. 219, n. 5, p. 219, 2009. ISSN 0949-944X.

KARL, S. et al. The iron distribution and magnetic properties of schistosome eggshells: implications for improved diagnostics. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. e2219, 2013. ISSN 1935-2735.

KATZ, N. et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972. ISSN 0036-4665.

KATZ. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintos**. FIOCRUZ Minas Gerais, 2018.

KHAN, P. et al. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, p. 1-23, 2014.

KING, C. H. et al. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **The Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561-1569, 2005. ISSN 0140-6736.

KING, C. L. et al. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3578-3584, 1998. ISSN 0022-1767.

KITTUR, N. et al. 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. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 3, p. 605-610, 2016. ISSN 0002-9637.

KNOPP, S. et al. Diagnostic accuracy of Kato-Katz and FLOTAC for assessing anthelmintic drug efficacy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, p. e1036, 2011. ISSN 1935-2735.

KLOETZL, K. A collagenase-like enzyme diffusing from eggs of *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 608-609, 1967.

KRICKA, L. Clinical applications of chemiluminescence. **Analytica chimica acta**, v. 500, n. 1-2, p. 279-286, 2003. ISSN 0003-2670.

KUBO, H.; TORIBA, A. Chemiluminescence flow injection analysis of reducing agents based on the luminol reaction. **Analytica chimica acta**, v. 353, n. 2-3, p. 345-349, 1997. ISSN 0003-2670.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Mild, moderate and intense Symmers's fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 611-612, 2009. ISSN 0037-8682.

LEITE, O.D., FATIBELLO-FILHO, O. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas de quimiluminescência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 337-34, 2004.

LENZI, H.L. et al. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 3-4, p. 433-5, 1987.

LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 77-90, 1991. ISSN 0074-0276.

LEVECKE, B. et al. Effect of sampling and diagnostic effort on the assessment of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis and drug efficacy: a meta-analysis of six drug efficacy trials and one epidemiological survey. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1826-1840, 2014. ISSN 0031-1820.

LICHTENBERGOVÁ, L. et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite immunology**, v. 30, n. 11-12, p. 585-595, 2008. ISSN 0141-9838.

LINDHOLZ, C. G. et al. 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**, v. 12, n. 3, p. e0006274, 2018. ISSN 1935-2735.

LINDLEY, P. F. Iron in biology: a structural viewpoint. **Reports on Progress in Physics**, v. 59, n. 7, p. 867, 1996. ISSN 0034-4885.

LODH, N. et al. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infection from filtered urine in

Zambia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 1, p. 46-50, 2013. ISSN 0002-9637.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. ISSN 1092-2172.

McCARTHY, J.S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: diagnostics for control and elimination programmes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.4, p. e1601, 2012.

MAHMOUD, A.A.F. **Esquistossomose e outras infecções por trematódeos**. In: Braunwald E, Kasper DL, Fauci AS, et al. (editores). Harrison medicina interna. 17^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; p. 1330-5, 2009.

McMANUS, P. et al. Schistosomiasis. **Nature**, n. 4, p. 7-19, 2018.

MATHIESON, W.; WILSON, R. A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 5, p. 617-628, 2010. ISSN 0020-7519.

MELO, A.; COELHO, P. *Schistosoma mansoni* e a doença. **Neves DP, organizador. Parasitologia humana. São Paulo: Editora Atheneu**, p. 193-212, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, fialriose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases – Plano de ação 2011-2015**. 1^o ed. Reimpressão, Brasília, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4^a ed. MS/SVS/DVDT, Brasília, 2014.

MOOLENBEEK, C.; RUITENBERG, E. The 'Swiss roll': a simple technique for histological studies of the rodent intestine. **Laboratory animals**, v. 15, n. 1, p. 57-60, 1981. ISSN 0023-6772.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M.; MORENO-CARVALHO, O. A. Neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni*: a review of pathogenesis, clinical syndromes and diagnostic approaches. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 4, p. 179-184, 2005. ISSN 0036-4665.

NEILL, P. J. et al. The ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* egg. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 39, n. 1, p. 52-65, 1988. ISSN 0002-9637.

NETO, L. et al. Análise espacial dos casos humanos de esquistossomose em uma comunidade horticultora da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, p. 771-780, 2012. ISSN 1415-790X.

NEVES, P. et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 777-790, 2010. ISSN 1074-7613.

NGAIZA, J. R.; DOENHOFF, M. J. Blood platelets and schistosome egg excretion. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 193, n. 1, p. 73-79, 1990. ISSN 0037-9727.

NGAIZA, J. R.; DOENHOFF, M. J.; JAFFE, E. A. *Schistosoma mansoni* egg attachment to cultured human umbilical vein endothelial cells: an in vitro model of an early step of parasite egg excretion. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1576-1580, 1993. ISSN 1537-6613.

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**, v. 97, p. 167-169, 2002. ISSN 0074-0276.

OBATA, H. et al. Automated determination of iron in seawater by chelating resin concentration and chemiluminescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1524-1528, 1993. ISSN 0003-2700.

OLIVEIRA, W. J. et al. 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**, v. 12, n. 2, p. e0006232, 2018. ISSN 1935-2735.

OLIVER-GONZÁLEZ, J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of infectious diseases**, p. 86-91, 1954. ISSN 0022-1899.

PEARCE, E.J., MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n.7, p. 499-511, 2002.

PELLEGRINO, J. et al. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosomiasis mansoni* in mice **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.11, p. 201-215, 1962.

PELLEGRINO, J.; GOELHO, P. *Schistosoma mansoni*: wandering capacity of a worm couple. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 1, p. 181-182, 1978. ISSN 0022-3395.

PLUMMER, D. T. The estimation of DNA by the dipenylamine reaction. **An introduction to practical biochemistry**, p. 215, 1978.

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**, v. 59, n. 1, p. 150-154, 1998. ISSN 0002-9637.

PRATA, A. Biópsia retal na esquistossomose mansoni: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento. 1957.

PRATA, **A Esquistossomose Mansônica**. Tratado de infectologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p1695-1720, 2007.

PROTASIO, A. V. et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1455, 2012. ISSN 1935-2735.

RADI, R. et al. Cytochrome c-catalyzed oxidation of organic molecules by hydrogen peroxide. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 288, n. 1, p. 112-117, 1991. ISSN 0003-9861.

RADZISZEWSKI, B. Untersuchungen über hydrobenzamid, amarin und lophin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 10, n. 1, p. 70-75, 1877. ISSN 0365-9496.

RAO, K.; RAMASWAMY, K. Cloning and expression of a gene encoding Sm16, an anti-inflammatory protein from *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 108, n. 1, p. 101-108, 2000. ISSN 0166-6851.

REY, L. **Parasitologia**. 3ªed. Ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, p 413-441, 2001.
ROBIJN, M. L. et al. *Schistosoma mansoni* eggs excrete specific free oligosaccharides that are detectable in the urine of the human host. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 151, n. 2, p. 162-172, 2007. ISSN 0166-6851.

ROSS, A. G. et al. Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st century. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 270-295, 2001. ISSN 0893-8512.

ROSS, A. G. et al. Katayama syndrome. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 3, p. 218-224, 2007. ISSN 1473-3099.

SANDOVAL, N. et al. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. **Experimental parasitology**, v. 114, n. 2, p. 84-88, 2006. ISSN 0014-4894.

SANIN, D. E. et al. Helminth infection and commensal microbiota drive early IL-10 production in the skin by CD4+ T cells that are functionally suppressive. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004841, 2015. ISSN 1553-7374.

SANTOS, P.; CHAVES, M. Ultrastructural and biochemical detection of biotin and biotinylated polypeptides in *Schistosoma mansoni*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, p. 837-842, 1997. ISSN 0100-879X.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-Iting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

SEED, J. L. et al. Phenol oxidase activity: induction in female schistosomes by in vitro incubation. **The Journal of parasitology**, p. 283-289, 1978. ISSN 0022-3395.

SECOR, W.R.; COLLEY, D.G. When Should the Emphasis on Schistosomiasis Control Move to Elimination? **Infectious Diseases and Tropical Medicine**, v. 15, n. 3, p. 1-9, 2018

SEITZ, W. R. [38] Chemiluminescence detection of enzymically generated peroxide. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.57, 1978. p.445-462. ISBN 0076-6879.

SHANE, H. L. et al. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. e951, 2011. ISSN 1935-2735.

SOUSA-FIGUEIREDO, J. C. et al. Treatment of intestinal schistosomiasis in Ugandan preschool children: best diagnosis, treatment efficacy and side-effects, and an extended praziquantel dosing pole. **International Health**, v. 2, n. 2, p. 103-113, 2010. ISSN 1876-3413.

SOUZA, F. P. C. D. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006. ISSN 1473-3099.

STOTHARD, J. R. et al. *Schistosoma mansoni* infections in young children: when are schistosome antigens in urine, eggs in stool and antibodies to eggs first detectable? **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. e938, 2011. ISSN 1935-2735.

STURROCK, R. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 17-27, 2001. ISSN 0074-0276.

SULAHIAN, A. et al. Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of schistosomiasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 4, p. 548-551, 2005. ISSN 1556-6811.

SUROLIA, N.; PADMANABAN, G. De novo biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 187, n. 2, p. 744-750, 1992. ISSN 0006-291X.

TARAFDER, M. et al. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a 'gold standard'. **International journal for parasitology**, v. 40, n. 4, p. 399-404, 2010. ISSN 0020-7519.

TEIXEIRA, C. F. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 1, n. 2, p. e73, 2007. ISSN 1935-2735.

TOH, S. Q. et al. Haem uptake is essential for egg production in the haematophagous blood fluke of humans, *Schistosoma mansoni*. **The FEBS journal**, v. 282, n. 18, p. 3632-3646, 2015. ISSN 1742-4658.

TURNER, J. D. et al. Blood flukes exploit Peyer's Patch lymphoid tissue to facilitate transmission from the mammalian host. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 12, p. e1003063, 2012. ISSN 1553-7374.

UTZINGER, J. et al. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1859-1874, 2009. ISSN 1469-8161.

VAN LIESHOUT, L. et al. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. **Acta tropica**, v. 77, n. 1, p. 69-80, 2000. ISSN 0001-706X.

VENNERVALD, B. J. et al. Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a *Schistosoma mansoni* endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 9, n. 4, p. 461-470, 2004. ISSN 1360-2276.

VERANI, J. R. et al. Schistosomiasis among young children in Usoma, Kenya. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 5, p. 787-791, 2011. ISSN 0002-9637.

WHITFIELD, P. J. **The biology of parasitism: an introduction to the study of associating organisms**. Edward Arnold., 1979. ISBN 0713127627.

WIEDEMANN, E. Ueber Fluorescenz und Phosphorescenz I. Abhandlung. **Annalen der Physik**, v. 270, n. 7, p. 446-463, 1888. ISSN 0003-3804.

WILKINS, H. et al. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a Gambian community. III. Acquisition and loss of infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 227-232, 1984. ISSN 1878-3503.

WILSON, R.; SCHIFFRIN, D. Chemiluminescence of luminol catalyzed by electrochemically oxidized ferrocenes. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1254-1257, 1996. ISSN 0003-2700.

WILSON, S. et al. Chronic hepatosplenomegaly in African school children: a common but neglected morbidity associated with schistosomiasis and malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1149, 2011. ISSN 1935-2735.

White EH, Roswell DF. The chemiluminescence of organic hydrazides. **Accounts of Chemical Research**, v. 3, n. 54, 1970.

WHO. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis**. WHO expert committee. Geneva: World Health Organization, 2002.

WHO. **Schistosomiasis**. Wkly Epidemiol Rec. 85:158–164, 2010.

WHO. **Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes**. Geneva: World Health Organization, 2011. ISBN 9244548267.

WHO. **Schistosomiasis. Progress Report 2001-2011 and Strategic Plan 2012-2020**. Geneva: World Health Organization, 2013.

WHO. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015**. World Health Organization, 2015. ISBN 9241564865.

WHO. **Schistosomiasis**. 2016. Fact Sheet No115. WHO Geneva, Switzerland, 2016.

WHO. **Lymphatic filariasis, onchocerciasis, schistosomiasis, soil-transmitted helminthiasis and trachoma: Preventive chemotherapy for neglected tropical diseases**. World Health Organization, 2015. ISBN 978-92-4-151215-2

WU, Y. et al. Differential platelet adhesion to distinct life-cycle stages of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 10, p. 2146-2148, 2007. ISSN 1538-7933.

YU, J. et al. Variations in fecal *Schistosoma japonicum* egg counts. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, n. 3, p. 370-375, 1998. ISSN 0002-9637.

ZONI, A. C. et al. 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**, v. 10, n. 3, p. e0004493, 2016. ISSN 1935-2735.

ANEXOS

ANEXO A - Certificação de adição de invenção



29/03/2017 870170020828
15:44
00.000.2.2.17.0107026.4

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 006478 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA - MANTENEDORA DA PUCRS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 88630413000109

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Ipiranga, 6681 - Predio 99A - Sala 212 - Bairro Partenon

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90001-970

País: Brasil

Telefone: (51) 33203907

Fax:

Email: juliana.panosso@pucls.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/03/2017 às 15:44, Petição 870170020828

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE DETECÇÃO DE OVOS DE SCHISTOSSOMA SPP.

Resumo: A presente invenção descreve um processo de detecção de helmintos. Especificamente, a presente invenção compreende a mensuração por espectrofotometria de luminescência, assim amostras que emitem luz visível confirmam a presença da parasitose reduzindo o esforço e tempo na busca de ovos do helminto por microscopia. A presente invenção se situa nos campos da Medicina, Química e Farmácia

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Ricardo Amaral Remer

Numero OAB:

Numero API: 1856

CPF/CNPJ: 71468374915

Endereço: Rua São José, 40, 4º andar

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20010-020

Telefone: 21-3231-9062

Fax: 11-3231-9039

Email: remer@remer.com.br

Escritório:

Nome ou Razão Social: Remer Villaça & Nogueira Assessoria e Consultoria de Prop. Intelectual S/S Ltda.

CPF/CNPJ: 07336918000155

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/03/2017 às 15:44, Petição 870170020828

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2**Nome:** VIVIAN FAVERO**CPF:** 81933657049**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Rua La Plata, 800, apto 205, Jardim Botânico**Cidade:** Porto Alegre**Estado:** RS**CEP:** 90670-040**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 2 de 2****Nome:** CARLOS GRAEFF TEIXEIRA**CPF:** 28744675020**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av. Juca Batista, 9000, casa 1190**Cidade:** Porto Alegre**Estado:** RS**CEP:** 91780-070**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:**

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU-Depósito_A0047-16_Helmintex 2_comp.pagamento.pdf
Procuração	ProcuracaoUBEA2017.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/03/2017 às 15:44, Petição 870170020828

ANEXO B - Aprovação CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 17/2015 - CEUA

Porto Alegre, 17 de abril de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

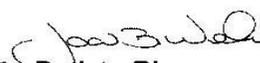
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00443, intitulado **“Manutenção do ciclo e produção de antígenos diagnósticos dos helmintos: Schistosoma mansoni, Angiostrongylus cantonensis e A. costaricensis”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
20 animais por mês de cada espécie	Rattus norvegicus Camundongo Oligoryzomys sp.	04/2015 – 03/2019

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C - Parecer consubstanciado do CEP - Estância/SE

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de desempenho de métodos diagnósticos em área de alta prevalência de esquistossomose, município de Estância, Sergipe

Pesquisador: Carlos Graeff Teixeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48809715.1.0000.5336

Instituição Proponente: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: CNPQ
MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.283.605

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo prospectivo que visa descrever e comparar o desempenho de diferentes métodos parasitológicos e imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose. O estudo se dará no município de Estância-Sergipe, o qual foi escolhido por ser uma área de alta prevalência da doença (endêmica).

Objetivo da Pesquisa:

Descrever e comparar o desempenho de métodos parasitológicos e imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose em indivíduos infectados de área endêmica com alta prevalência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Entende-se que os riscos são mínimos, pois envolverá apenas uma punção venosa antecubital e a coleta de amostra fecal. Os benefícios deste trabalho envolvem a possibilidade de obtenção de exames mais sensíveis para detectar a infecção e prover atendimento médico adequado mais precoce, evitando doença grave; também poderá haver contribuição para o controle da transmissão com redução/eliminação do risco da doença.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.283.605

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Entende-se que esta pesquisa poderá contribuir para melhorar o diagnóstico da esquistossomose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa apresenta TCLE e Termo de assentimento.

Recomendações:

Realizar ajustes no cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atender as recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_393066.pdf	01/09/2015 18:30:50		Aceito
Outros	Links_Lattes.pdf	01/09/2015 18:30:23	Carlos Graeff Teixeira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_393066.pdf	15/07/2015 19:09:52		Aceito
Outros	sipesq.controle.servlet.analisecc_unificad.pdf	15/07/2015 19:09:31		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_393066.pdf	03/07/2015 17:44:49		Aceito
Outros	aprovação_comissao_cientifica.pdf	19/06/2015 18:37:38		Aceito
Outros	Termo de assentimento do menor Estância 29maio2015.doc	29/05/2015 19:42:22		Aceito
Outros	termosDeConcessao.pdf	29/05/2015 19:41:42		Aceito
Outros	Concessão_2.pdf	29/05/2015 19:41:18		Aceito
Outros	Concessão_1.pdf	29/05/2015 19:40:02		Aceito
Outros	Orçamento_Estância29maio2015.doc	29/05/2015 19:38:41		Aceito
Outros	Currículo Lattes ou link para acesso.docx	29/05/2015 19:08:52		Aceito
Outros	Carta de conhecimento e autorização assinada pelo responsável pelo local onde a pesquisa será realizada.docx	29/05/2015 19:08:01		Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.283.605

Outros	DECLARAÇÃO_SMS_Estância.pdf	29/05/2015 19:06:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Estancia_2014.doc	11/09/2014 19:44:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Estância_2014_versão140909_CEP.doc x	11/09/2014 18:50:44		Aceito
Folha de Rosto	Folha_rostoCOnepe_Estancia2014.pdf	11/09/2014 18:43:26		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 16 de Outubro de 2015

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

ANEXO D – Aprovação SIPESQ

SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6857

Porto Alegre, 22 de setembro de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Caracterização da estrutura e superfície dos ovos de *Schistosoma mansoni* em diferentes estágios de desenvolvimento para o uso da quimioluminescência e suas interações com o hospedeiro" coordenado por VINICIUS DUVAL DA SILVA. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA

ANEXO E - Artigo publicado no ano de 2018 na revista *PLOS Neglected Tropical Diseases*, em colaboração com professor Dr. Stefan Michael Geiger - UFMG.

RESEARCH ARTICLE

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

Warlem Junio Oliveira^{1*}, Fernanda do Carmo Magalhães^{1*}, Andressa Mariana Saldanha Elias¹, Vanessa Normandio de Castro¹, Vivian Favero², Catieli Gobetti Lindholz², Áureo Almeida Oliveira³, Fernando Sergio Barbosa¹, Frederico Gil¹, Maria Aparecida Gomes¹, Carlos Graeff-Teixeira², Martin Johannes Enk⁴, Paulo Marcos Zech Coelho³, Mariângela Carneiro¹, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa¹, Stefan Michael Geiger^{1*}

1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2 Grupo de Parasitologia Médica, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 3 Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil, 4 Secretaria de Vigilância em Saúde, Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, Belém, Brasil

* These authors contributed equally to this work.
* stefan.geiger76@gmail.com


 OPEN ACCESS

Citation: Oliveira WJ, Magalhães FdC, Elias AMS, de Castro VN, Favero V, Lindholz CG, et al. (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 Negl Trop Dis* 12(2): e0006232. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232>

Editor: Lisette van Lieshout, Leiden University Medical Center, NETHERLANDS

Received: August 1, 2017

Accepted: January 11, 2018

Published: February 22, 2018

Copyright: © 2018 Oliveira 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: The authors received financial support from the National Brazilian Research Council (CNPq) for research in neglected tropical diseases, DECI program 2012 #404405/2012-6. MC is grateful to CNPq for research fellowships. MC and DANC received financial support from Fundação de

Abstract

Background

In some tropical countries, such as Brazil, schistosomiasis control programs have led to a significant reduction in the prevalence and parasite burden of endemic populations. In this setting, the Kato-Katz technique, as the standard diagnostic method for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections, which involves the analysis of two slides from one fecal sample, loses its sensitivity. As a result, a significant number of infected individuals are not detected. The objective of this study was to perform extensive parasitological testing of up to three fecal samples and include a rapid urine test (POC-CCA) in a moderate prevalence area in Northern Minas Gerais, Brazil, and evaluate the performance of each test separately and in combination.

Methods and findings

A total of 254 individuals were examined with variants of the standard Kato-Katz technique (up to 18 Kato-Katz slides prepared from three fecal samples), a modified Helmintex (30 g of feces), the saline gradient (500 mg of feces), and the POC-CCA methods. We established a reference standard taking into consideration all the positive results in any of the parasitological exams. Evaluation of the parasite burden by two Kato-Katz slides confirmed that most of the individuals harbored a light infection. When additional slides and different parasitological

Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), within the program to support researchers from the State of Minas Gerais, Brazil (PPM program). SMG received additional financial support from the World Health Organization, TDR Program (Small Grants Scheme, #A-869/2015). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

methods were included, the estimated prevalence rose 2.3 times, from 20.4% to 45.9%. The best sensitivity was obtained with the Helmintex method (84%). All parasitological methods readily detected a high or moderate intensity of infection; however, all lost their high sensitivity in the case of low or very low intensity infections. The overall sensitivity of POC-CCA (64.9%) was similar to the six Kato-Katz slides from three fecal samples. However, POC-CCA showed low concordance ($\kappa = 0.34$) when compared with the reference standard.

Conclusions

The recommended Kato-Katz method largely underestimated the prevalence of *S. mansoni* infection. Because the best performance was achieved with a modified Helmintex method, this technique might serve as a more precise reference standard. An extended number of Kato-Katz slides in combination with other parasitological methods or with POC-CCA was able to detect more than 80% of egg-positive individuals; however, the rapid urine test (POC-CCA) produced a considerable percentage of false positive results.

Author summary

Human infection with the flatworm *Schistosoma mansoni* continues to be a public health problem in many tropical countries, including Brazil. The parasitological method recommended by the World Health Organization for the detection of intestinal schistosomiasis, the Kato-Katz method (KK), underestimates the prevalence of the infection in endemic areas with reduced parasite burden. When extensive and supplementary parasitological exams were performed, the prevalence of schistosomiasis in the examined population increased 2.3 times. Additional KK slides and other parasitological methods, such as saline gradient and Helmintex, allowed us to establish a strong reference standard that was used to assess the parasitological tests and the rapid urine test for the detection of the circulating cathodic antigen of *S. mansoni* (POC-CCA). All tests readily detected the presence of the flatworm in individuals with medium to high parasite loads. The Helmintex method showed the best performance as it detected almost 84% of all infected individuals. A variant of the standard KK method, involving six fecal smears from three stool samples, detected two-thirds of all infections, thus having a performance comparable to that found with the POC-CCA. A combination of this variant KK method with the POC-CCA may be a field-applicable alternative to improve the diagnosis of *S. mansoni* infections in individuals with low parasite loads in endemic areas.

Introduction

Recent estimates of helminth infections indicate the existence of more than one billion infected individuals in underdeveloped areas of Africa, Asia, and in Central and South America [1]. Among the different trematode species infecting humans, schistosome species are the parasites with the highest impact on public health, affecting more than 240 million individuals and with 700–800 million people living at risk of infection [2–4]. In sub-Saharan Africa, approximately 280,000 deaths per annum have been attributed to schistosome infections and their clinical complications [5]. In Brazil, the only schistosome species transmitted among the

human population is *Schistosoma mansoni* and estimates vary between 1.5 and 6 million infected individuals [1, 6, 7, 8, 9].

Since the implementation of the National Schistosomiasis Control Program (NSCP) in the 1970s and decades of consequent chemotherapeutic interventions, the Brazilian health authorities reported significant improvements in terms of transmission, prevalence, and parasite load in the country's endemic regions, especially in the states of Minas Gerais and Bahia [10]. In this new epidemiological scenario, most of the infected individuals in endemic areas harbor low parasite loads and are very unlikely to be detected with the commonly used parasitological methods [11,12].

The Kato-Katz method (KK) [13] is recommended by the World Health Organization (WHO) as the standard method for the detection of *S. mansoni* infection [14–16]. It is very efficient in individuals with high to medium parasite loads, e.g. more than 100 eggs per gram of feces, but shows reduced sensitivity in individuals with low parasite loads. As a consequence, the real prevalence in an endemic setting may be significantly underestimated and that has led to shortcomings in the control of schistosomiasis in these areas [17–20]. An important result of the NSCP was a significant reduction in the number of severe clinical cases and deaths due to *S. mansoni* infection [21, 22]. However, the failure to correctly identify all or most of the individuals with low parasite burden by the standard parasitological approach (1 or 2 KK slides) has contributed to the continuation of *S. mansoni* infection, with accompanying contamination of the environment, especially the water bodies, and hence, allow reinfection in endemic areas. Therefore, if new WHO guidelines about the elimination of schistosome infections in the world are sought to be achieved [16], new and more sensitive methods, apart from the standard KK test, will have to be applied.

Due to the reduced performance of the KK method for the diagnosis of *S. mansoni* infection in areas with low endemicity, new parasitological methods have been developed such as saline gradient [23] and Helminx [24]. Even immunological methods have been re-evaluated in order to improve detection of *S. mansoni* infection in endemic populations [25–27]. As an alternative to enhance the specificity of immunological methods for the diagnosis of schistosome infections, some assays focus on the detection of parasite-secreted antigens in serum or urine samples of infected individuals [28]. Indeed, circulating cathodic antigens (CCA) of *S. mansoni* are released into the circulation by juvenile and adult schistosomes and the levels of these antigens correlate with the worm burden, thus indicating active infection [29–31]. Based on these initial studies, a rapid antigen test, the Point-of-Care-CCA rapid test (POC-CCA) was developed and is commercially available. It detects the circulating antigen in urine samples and has a higher sensibility than the standard KK method when it was evaluated in schistosomiasis endemic areas in Africa [32–35]. However, most of these studies were restricted to Africa and they only compared the POC-CCA reactivity in urine samples with parasitological results obtained with the standard KK method and using this method as the reference standard [36]. Since the KK method is not sensitive enough to identify individuals with low parasite burden and serve as a 'gold standard', the real efficiency of the POC-CCA to detect *S. mansoni* infection in endemic populations remains to be validated in relation to more sensitive parasitological, molecular, and serological methods.

In the present study, we performed a combination of alternative parasitological methods to detect more precisely intestinal schistosomiasis in an endemic area in Brazil. The thorough parasitological investigation allowed us to implement a new reference standard to detect active *S. mansoni* infection and to evaluate each of the parasitological methods for its performance and accuracy. Moreover, we analyzed the potential of POC-CCA rapid urine test as an alternative for time-consuming parasitological exams in detecting individuals with low parasite

burden commonly found in endemic areas subjected to long-term chemotherapeutic interventions.

Materials and methods

Ethics statement

The present study was approved by the Ethics Committee of the Research Center René Rachou—FIOCRUZ and all project details have been registered on the Brazilian Platform for Research with Human Subjects (Plataforma Brasil) under the following number: CAAE#21824513.9.0000.5091. Before any research activities, the local health authorities were contacted and agreed to collaborate with the researchers from the different institutions. All enrolled participants were required to sign an informed consent form. Parents or legal guardians signed the informed consent when minors were involved.

When the parasitological results were positive, the relevant individuals were informed and received free oral treatment at the local health clinic. Schistosomiasis: praziquantel (40 mg/kg for adults and 60 mg/kg for children); intestinal helminths: albendazole (400 mg); protozoan parasites: metronidazole (250 mg/2x/ 5 days).

Study area and population

The study was conducted in a rural area of the district of Brejo do Amparo, Municipality of Januária (S1 Fig Supplemental Information), located in the northern part of Minas Gerais State, Brazil, approximately 600 km from the capital Belo Horizonte. The community is located along the margins of the Tocantins brook and consists of roughly 270 individuals in total. In local meetings and house-to-house visits, the project was explained to all interested inhabitants, and stool exams were offered. A family-based socio-economic questionnaire was applied to gather information on household construction, water supply, sanitation, and other socio-economical aspects. Also, an individual questionnaire was used to record demographic and occupational information and to indicate previous clinical conditions that might be relevant for the research. Based on past interventions carried out by the local health authorities responsible for schistosomiasis control, a prevalence of *S. mansoni* infection between 15–20% was expected in this area. According to these authorities, no schistosomiasis control interventions had been performed in the localities during the last two years before the beginning of the present study.

Collection of biological samples and laboratory procedures

Participants were asked to provide a urine sample and three fecal samples, which were collected on consecutive days. Fecal samples were brought to the field laboratory in Januária to be processed by the different parasitological methods. The flow diagram in Fig 1 shows the total number of samples analyzed by each parasitological test and the results obtained with the rapid urine test (POC-CCA). At least 50 grams of feces were collected with the first fecal sample using a 500 ml plastic container, which is sufficient for a complete fecal evacuation. The fecal samples collected in the following days were small and, therefore, 80 ml plastic cups were used.

Variants of the standard KK technique [13] were performed by preparing 14 slides with the first fecal sample and two slides for the second, and third samples. Slides were examined under the microscope (100x) for the presence of *S. mansoni* eggs and other intestinal helminths. The exams were conducted by experienced microscopists at the Centro de Pesquisas René Rachou and the Universidade Federal de Minas Gerais. At least 15% of all slides had their reading

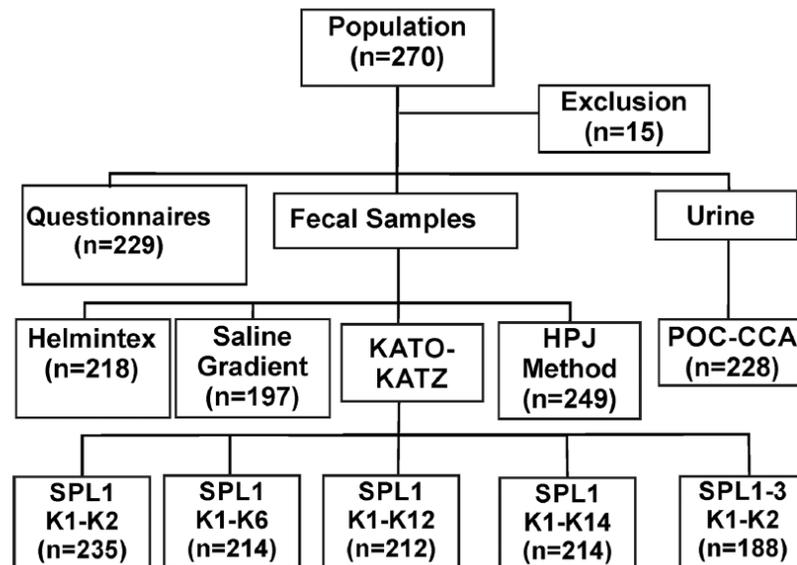


Fig 1. Flowchart describing the workflow for the diagnosis of intestinal schistosomiasis in an endemic population within the district of Brejo do Amparo, Januária, Minas Gerais, Brazil. Fecal samples were examined with the Kato-Katz technique with one fecal sample and two (SPL1 K1-K2), six (SPL1 K1-K6), 12 (SPL1 K1-K12), and 14 thick-smears (SPL1 K1-K14), or with three fecal samples with two slides each (SPL1-3 K1-K2), saline gradient, Helmintex and spontaneous sedimentation technique (HPJ). Further, individual urine samples were analyzed with the point-of-care rapid urine test (POC-CCA) that detects the circulating cathodic antigen of *Schistosoma mansoni*. The numbers in brackets indicate the number of individuals tested with each method.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g001>

confirmed by a second microscopist, after random selection. The intensity of infection was calculated by determining the mean number of *S. mansoni* eggs found in each slide and multiplying the mean obtained by 24 to determine the number of eggs per gram of feces (EPG). According to the World Health Organization [14], the intensity of *S. mansoni* infection can be categorized as light (1–99 EPG), moderate (100–399 EPG), or heavy (≥ 400 EPG). The spontaneous sedimentation method [37] was used to evaluate the presence of protozoan parasites in fecal samples.

Next, a subsample was taken from the first fecal sample and processed following the saline gradient technique and a modified Helmintex method. For the saline gradient method [23], a suspension of 500 mg of feces was subjected to a slow flow of a 3% saline solution during one hour. Subsequently, the supernatant was removed and the sediment was placed onto microscope slides to search for *S. mansoni* eggs. The modified Helmintex method was performed as described by Favero and colleagues [38]. Briefly, 30 grams of feces from the first fecal sample were suspended in 70% ethanol, treated with detergent (Tween-20), subjected to repetitive filtration and sedimentation steps, the addition of a solution with magnetic particles, and the separation of *S. mansoni* eggs using a magnetic field. Finally, the free suspension was discarded and the attached particles, which formed the final sediment, were mixed with 3% ninhydrin solution and transferred onto microscope slides to search for *S. mansoni* eggs [38].

As mentioned above, each participant was also asked to provide a urine sample to perform the rapid urine test (POC-CCA, Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, South Africa) and detect the circulating cathodic antigen of *S. mansoni*. To this end, first-morning urine samples were

collected, transferred to the field laboratory in Januária, aliquoted in 10–15 ml samples, and stored at -20°C until further testing. The test followed the manufacturers' guidelines, and was read 20 minutes after addition of the urine sample and buffer solution. Test results were scored as negative if the circulating cathodic antigen band was absent. Positive results were scored as trace (very light band), weak (+), medium (++) and strong (+++) depending on the intensity of the circulating cathodic antigen band [28, 39]. Cases with trace results for the circulating cathodic antigen of *S. mansoni* were considered as positive. The tests were scored independently by two investigators. In case of conflicting results, a third investigator was consulted.

Statistical analyses and performance of the parasitological methods

Analyses were performed using Open Epi, version 3.03 and GraphPad Prism, version 5.0. In order to evaluate the performance of the different diagnostic tests, a "Reference Standard" was established, which included all positive results (visible eggs) from any of the parasitological methods used (18 KK slides, saline gradient, and Helminthex). Normal distribution of the data was verified by the Shapiro-Wilk test. For non-parametric data and categorical variables, the Chi-square test was used. To compare the means for continuous variables, the Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test were used, with a p -value ≤ 0.05 considered significant. The overall prevalence of *S. mansoni* infection in the endemic area was calculated by the number of egg-positive individuals found in any of the parasitological exams, as defined by the "Reference Standard", divided by the total number of participants. To compare the performance and accuracy of each method, we calculated the sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive values (NPV), and concordance (kappa index). To evaluate the degree of concordance between the different methods, the kappa index (κ), which varies from 0 to 1.0, followed the following categorization: no agreement if $\kappa < 0.01$; bad if $0.01 \leq \kappa \leq 0.20$; weak if $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$; moderate if $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$; good if $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$, and excellent agreement if $\kappa > 0.81$ [40]. The relationship between the intensity of infection, as determined by the mean EPG value of two slides from the first fecal sample and the semi-quantitative intensity of POC-CCA results was examined by the Spearman's rank correlation test.

Results

Characterization of the study population

As shown in Table 1, the parasitological study included 257 individuals, of which 122 were male (47.5%) and 135 female (52.5%). Age of the participants ranged from 2–88 years, with a mean age of 34.9 years (SD ± 22.6) and a median age of 32 years (interquartile range 15–51 years). The number of individuals was equally distributed throughout the different age groups. The study population was of low income and educational level: 90% of adult individuals earned minimum Brazilian wages, and almost 80% had only elementary education or less. The primary drinking water source is the local brook (60% of the residences) and the domestic sewage receives no treatment.

The initial fecal analyses performed with the saline gradient and the standard KK (two slides) methods revealed that 85 individuals were positive for protozoan cysts and 81 individuals eliminated helminth eggs in the fecal samples (Table 2). The most prevalent helminthic infections were intestinal schistosomiasis (20.4%) and hookworm (9.8%). The mean number of *S. mansoni* eggs in infected individuals was 210 ± 645.8 EPG. Among these 48 infected individuals, most (66.7%; $n = 32$) had a low parasite load of less than 100 EPG, 25% ($n = 12$) had a moderate infection, and 8.3% were heavily infected (Fig 2A). There was no statistically significant association between the prevalence and the intensity of schistosomiasis with gender. Also,

Table 1. Selected socio-economic parameters and demographics of the study population in a rural community of Brejo do Amparo, Januária, Minas Gerais, Brazil.

Variables	Category	Total N (%)	Prevalence (%)	Parasite Load Eggs/g feces (Means ±SD) ^(d)
Sex ^(a)	Male	112 (48.9)	21.0	57.6±396.7
	Female	117 (51.1)	19.8	28.5±162.9
Age Category ^(a)	≤ 10	38 (16.6)	7.3	8.9±35.1
	11–20	43 (18.8)	27.7	153.0±679.9
	21–40	61 (26.6)	27.9	36.0±91.8
	41–60	60 (26.2)	15.4	9.6±47.3
	>60	27 (11.8)	8.3	8.7±38.8
Educational level ^(b)	No education	123 (59.4)		
	Primary school	33 (15.9)		
	Secondary school	43 (20.8)		
	Higher education	8 (3.9)		
Income (Brazilian minimum wage) ^(c)	< 1 salary	19 (35.9)		
	1–2 salaries	16 (30.1)		
	> 2 salaries	18 (34.0)		
Water Supply ^(c)	Covered well	21 (39.6)		
	Stream	32 (60.4)		
Sewage system ^(c)	Rudimentary cesspool	47 (88.6)		
	Does not know or no answer	6 (11.4)		

^(a)Variable evaluated by a questionnaire applied to each participant (n = 229)

^(b)Variable evaluated by a questionnaire applied to each participant (n = 207). Children under 6 years of age were excluded from the analysis

^(c)Variable evaluated by a questionnaire applied to the participants' families (n = 53 residences).

^(d)Parasite loads in males and females and in each age group are indicated as mean eggs per gram of feces ± standard deviation (SD), as determined by two KK slides from one fecal sample for each egg-positive individual.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t001>

the intensity of *S. mansoni* infection was similar among individuals of different age groups (Fig 2B).

Comparison of different methods for the diagnosis of schistosomiasis

To evaluate the sensitivity of the technique recommended by the WHO (two KK slides from one fecal sample) and other parasitological tests to identify *S. mansoni* infection, we performed thorough parasitological examinations using three fecal samples. Moreover, urine samples collected from the participating individuals were tested for the circulating cathodic schistosome antigen using the rapid urine test (POC-CCA), as described above.

The inclusion of additional parasitological methods for schistosome diagnosis resulted in the detection of a much higher number of infected individuals within the study population (Table 3). The apparent prevalence rose from 20.4 to 29.9%, when the number of KK slides was increased from two to 14 slides, or to 38.3%, when we used two slides prepared from each of the three fecal samples. Other parasitological methods that used a higher amount of fecal matter, such as the saline gradient and Helmintex, also detected a higher number of *S. mansoni*-infected individuals (Table 3). Overall, and taking into consideration the results of all the parasitological methods (reference standard), the prevalence of intestinal schistosomiasis reached 45.9%, which represents a 2.3 times increase in relation to the WHO's recommended standard KK procedure. The reference standard was used to evaluate the efficacy of each of the diagnostic methods tested. For the fecal techniques, the best performance was obtained with

Table 2. Prevalence of *Schistosoma mansoni* infection and other intestinal parasites in a rural community of the Municipality of Januária, Minas Gerais, Brazil.

	Number of infected	Prevalence (CI 95%)
Intestinal protozoa (n = 249)	85	34.1 (28.3–40.4)
<i>Entamoeba coli</i>	31	12.5 (8.6–17.2)
<i>Endolimax nana</i>	25	10.0 (6.6–14.5)
<i>Blastocystis hominis</i>	13	5.2 (2.8–8.8)
<i>Entamoeba histolytica/díspar</i>	9	3.6 (1.7–6.8)
<i>Giardia lamblia</i>	4	1.6 (0.4–4.1)
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	0.8 (0.1–2.9)
<i>Entamoeba hartmani</i>	1	0.4 (0.01–2.3)
	Number of Infected	Prevalence (CI 95%)
Helminths (n = 235)	81	34.5 (28.4–40.9)
<i>Schistosoma mansoni</i> *	48	20.4 (15.5–26.2)
Hookworm	23	9.8 (6.3–14.3)
<i>Enterobius vermicularis</i>	8	3.4 (1.5–6.6)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0.4 (0.01–2.3)
<i>Trichuris trichiura</i>	1	0.4 (0.01–2.3)
Coinfection (<i>S. mansoni</i> + Protozoa)	30	12.1 (8.6–16.7)
Coinfection (<i>S. mansoni</i> + other helminths)	11	4.7 (2.6–8.2)

* Positive for *Schistosoma mansoni*, as determined by two KK slides from one fecal sample.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t002>

the modified Helmintex method, which identified schistosome eggs in feces of 88 individuals (40.4% of prevalence). This parasitological method showed a high sensitivity (86.6%) and the highest degree of concordance in relation to the reference standard ($\kappa = 0.84$) (Table 3). The analysis also demonstrated that the sensitivity of the KK method increased from 41.4% with two slides from one fecal sample to up to 66.7% with six slides from three fecal samples. In comparison, if only one fecal sample was processed, the sensitivity remained around 60%, even when the number of examined slides was increased to 12 or 14 (Table 3 and Fig 3). The improved performance of the KK method due to an increased number of examined slides (14 slides) or increased sampling effort (three fecal samples) is shown in Fig 3.

Fig 4 shows the prevalence of *S. mansoni* infection for the different age groups and as a function of the parasitological methods, e.g. the standard KK method (2 slides from one fecal sample) versus the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helmintex). Using the reference standard, we found that children and young adults (11–20 years of age) had the highest prevalence (55%) for *S. mansoni* infection. In contrast, the prevalence was reduced to less than 50% in the other age groups, being further reduced in the elderly (older than 60 years of age). Importantly, the prevalence found in each age group, considering the combination of all parasitological exams (reference standard), was 1.7 to 4.7 times higher than the prevalence obtained with the recommended two KK slides from one fecal sample (Fig 4).

Classification of infected individuals and performance of the different parasitological methods according to the parasite load

The parasite load in *S. mansoni* infected individuals was determined by counting the eggs found in two KK slides from one fecal sample and converting the counts in eggs per gram of feces (EPG), according to standard procedures recommended by the WHO [14]. We assigned an EPG value of 1 for the individuals who were not detected by two KK slides, but who were

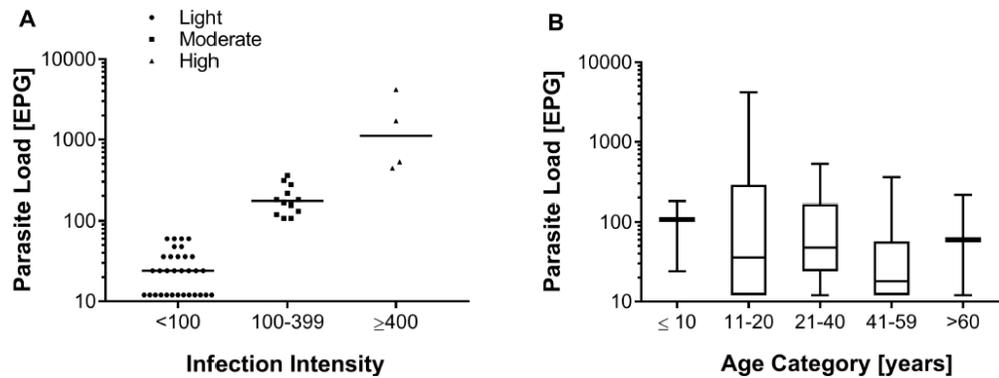


Fig 2. Classification of *Schistosoma mansoni*-infected individuals according to their parasitic load. A: Individual egg counts of one fecal sample analyzed with two Kato-Katz slides and classification of egg-positive individuals according to their parasite load. Infection intensity was determined by the number of eggs per gram of feces (EPG) and was classified as light (1–99 EPG, triangles), moderate (100–399 EPG, squares) or heavy (≥ 400 EPG, circles). Individual EPG values are plotted on a logarithmic scale and the horizontal bars indicate the mean EPG value in each category. B: Boxplots showing the median, interquartile ranges, and 95% intervals of the parasite load (EPG) by the different age groups and indicated on a logarithmic scale. Non-parametric Kruskal-Wallis test revealed no statistical significance between age groups ($p > 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g002>

found positive when additional slides were analysed or when other fecal exams were used.

Thus, we classified 102 individuals with a light parasite load (EPG: 1–99), 12 individuals with a moderate parasite load (EPG: 100–399), and four individuals with a heavy parasite load (EPG: 400 or more). Therefore, most of the infected individuals within the studied population had a light parasitic infection.

Next, we analyzed the performance of the parasitological methods in relation to the parasite load, with the individuals with a light infection being arbitrarily divided into three subgroups (Table 4). All the diagnostic methods readily detected individuals with heavy to moderate infections. On the other hand, the diagnostic methods decreased their sensitivity to detect individuals with a low parasite load, especially in fecal samples with less than 12 EPG. In this case, the best performance of the KK method (SPL1-3 K1-K2) reached a sensitivity of only 40%. In the group with a very low parasite load, the saline gradient and the rapid urine test had sensitivities of 33.9 and 50.8%, respectively. The Helmintex method showed the highest sensitivity for the group with very low parasite load (84.1%).

Table 3. Performance of different parasitological and immunochromatographic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in comparison with the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helmintex).

Method	Prevalence (%)	Sensitivity % (CI 95%)	Kappa Index (CI 95%)
SPL1 K1-K2	20.4	41.4 (32.8–50.5)	0.42 (0.31–0.52)
SLP1 K1-K6	29.0	56.4 (47.0–65.3)	0.56 (0.44–0.67)
SLP1 K1-K12	30.3	58.7 (49.3–67.5)	0.58 (0.46–0.70)
SLP1 K1-K14	29.9	58.2 (48.8–67.0)	0.58 (0.46–0.70)
SLP1-3 K1-K2	38.3	66.7 (57.3–74.9)	0.63 (0.50–0.76)
Saline Gradient	21.3	44.7 (35.0–54.7)	0.46 (0.34–0.58)
Helmintex	40.4	83.8 (75.6–89.6)	0.84 (0.71–0.97)
POC-CCA	47.4	64.9 (55.6–73.1)	0.34 (0.22–0.47)

Data shows the prevalence, sensitivity, and kappa index of concordance for the Kato-Katz technique obtained with the analysis of one fecal sample using two (SPL1 K1-K2), six (SPL1 K1-K6), 12 (SPL1 K1-K12), and 14 slides (SPL1 K1-K14), or obtained from two slides prepared from each of three fecal samples (SPL1-3 K1-K2), or obtained with the saline gradient, Helmintex, or with POC-CCA methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t003>

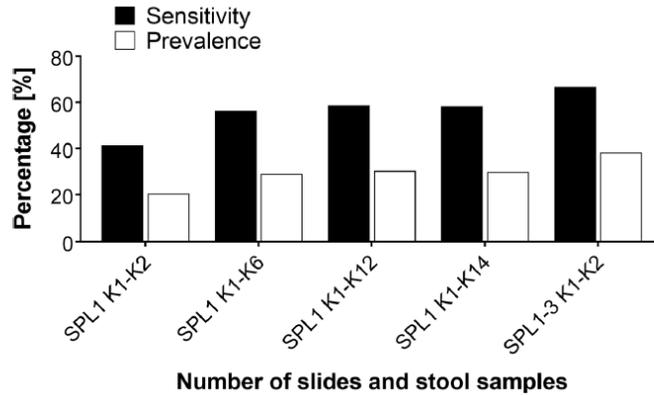


Fig 3. Prevalence of intestinal schistosomiasis and sensitivity of the Kato-Katz method, according to the number of examined slides and stool samples. Prevalence of *Schistosoma mansoni* infection (white bars), as determined by the analysis of one fecal sample with two (SPL1 K1-K2), six (SPL1 K1-K6), 12 (SPL1 K1-K12) or 14 slides (SPL1 K1-K14), or obtained with the analysis of two slides prepared from each of three fecal samples (SPL1-3 K1-K2). The sensitivity of the different numbers of Kato-Katz slides examined (black bars) was calculated in relation to the reference standard, which included the combined results of 18 Kato-Katz slides, the saline gradient, and the Helmintex methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g003>

Performance of the POC-CCA as diagnostic method for intestinal schistosomiasis

The POC-CCA identified 108 out of a total of 228 individuals as infected, which resulted in a prevalence of 47.4% and a sensitivity of 64.9%, when compared with the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helmintex). The sensitivity of the POC-CCA was

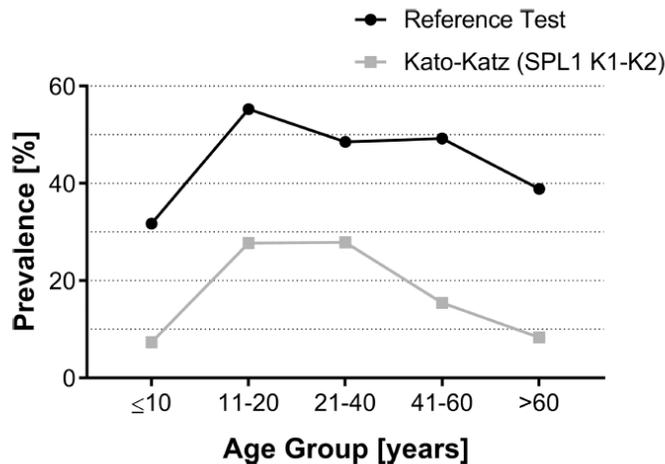


Fig 4. Prevalence profile of intestinal schistosomiasis in an endemic population divided by different age groups according to the different parasitological methods. Black circles indicate the prevalence profile in the population considering the sum of all parasitological methods used (reference standard: 18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helmintex); grey squares indicate the prevalence profile considering the recommended two KK slides from one fecal sample. Prevalence values (%) for each age group are indicated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g004>

Table 4. Sensitivity of different diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis considering the parasite load, as defined by egg counts of two Kato-Katz slides.

Diagnostic Method	Classification by Parasite Load (EPG value)				
	Sensitivity (%) of each diagnostic method				
	Heavy (EPG > 399) % Sensitivity	Moderate (EPG: 100–399) % Sensitivity	Light		
		(EPG: 99–50) % Sensitivity	(EPG: 49–12) % Sensitivity	(EPG < 12) % Sensitivity	
SPL1 K1-K2	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	0 (0/70)
SPL1 K1-K6	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	22.6 (14/62)
SPL1 K1-K12	100 (04/04)	100 (11/11)	100 (04/04)	100 (28/28)	27.4 (17/62)
SPL1 K1-K14	100 (04/04)	100 (11/11)	100 (04/04)	100 (28/28)	27.0 (17/63)
SPL1-3 K1-K2	100 (04/04)	100 (12/12)	100 (04/04)	100 (28/28)	40.0 (24/60)
Saline Gradient	100 (04/04)	100 (06/06)	33.3 (01/03)	50.0 (11/22)	33.9 (20/59)
Helmintex	100 (03/03)	100 (11/11)	75.0 (03/04)	75.0 (18/24)	84.1 (53/63)
POC-CCA	100 (04/04)	100 (10/10)	100 (04/04)	77.8 (21/27)	50.8 (34/67)

Data show the sensitivity (%) of each diagnostic method and the number of individuals detected positive for intestinal schistosomiasis versus the total number of examined individuals (in brackets), according to parasite load classification. Individuals with a light infection were arbitrarily divided into three subgroups with egg counts of 99–50 eggs per gram of feces (EPG), 49–12 EPG, and less than 12 EPG.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t004>

superior to the saline gradient and comparable to the results obtained with six KK slides from three fecal samples. However, the kappa index of the urine test was considerably lower than that obtained with the other parasitological tests (Table 5).

The performance of the POC-CCA is illustrated in Fig 5. The visual scores ranged from negative to trace, weak (+), moderate (++) and strongly positive (+++), with trace results considered a positive reaction for *S. mansoni* infection, as recommended by the manufacturer (Fig 5A). Comparing the POC-CCA result with the other parasitological analyses, we observed that, of the 139 negative individuals in the parasitological tests, only 116 participants provided urine samples for the POC-CCA test. Of these individuals, 81 (70%) were also found not reactive (negative) in the urine test. However, 33 urine samples (28%) from the individuals found negative by the other parasitological tests showed a trace reaction and another two samples (1.7%) of parasitologically negative individuals had a weak positive result (+) (Fig 5B). Among these 35 individuals, only four (11.4%) individuals had a hookworm infection and eight (22.9%) individuals presented with protozoan cysts in their feces.

From 118 individuals found positive for *S. mansoni* eggs in any of the parasitological exams (reference standard), 112 participants provided urine samples. Out of these 112 samples, 73 (65%) were tested positive for the circulating cathodic antigen of *S. mansoni* and were in

Table 5. Performance of the rapid urine test for circulating cathodic antigen of *Schistosoma mansoni* (POC-CCA), as compared with the reference standard of a positive result in any of the used parasitological methods.

Method	TP	FP	TN	FN	Prevalence % (n positives/ n total)	Sensitivity % (CI 95%)	Specificity % (CI 95%)	PPV (%)	NPV (%)	Kappa (CI 95%)
POC-CCA *	73	35	81	39	47.4 (n = 108 of 228)	64.9 (55.6–73.1)	69.2 (60.4–76.9)	66.7 (57.3–74.9)	67.5 (58.7–75.2)	0.34 (0.22–0.47)
POC-CCA**	30	2	114	82	14.0 (n = 32 of 228)	26.8 (19.5–35.7)	98.3 (93.9–99.5)	93.8 (79.9–98.3)	58.2 (51.2–64.9)	0.25 (0.17–0.35)

The POC-CCA test was evaluated considering trace results as a positive result (*), as indicated by the manufacturer, or considering trace results as a negative result (**). The data show the number of true positive (TP), false positive (FP), true negative (TN), and false negative (FN) individuals, as well as the prevalence (%), sensitivity, specificity, and kappa index, together with the respective confidence intervals (CI), of concordance of each test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t005>

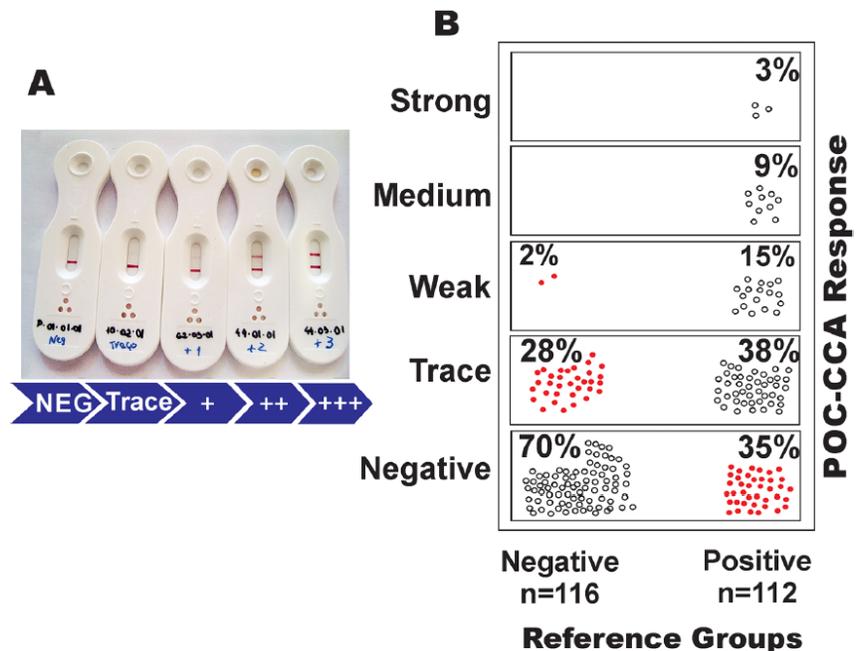


Fig 5. Performance of the rapid urine test (POC-CCA) for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. A: Photograph showing the different reactions possible with the POC-CCA: negative (NEG), trace (+), medium (++) and strong (+++). B: Distribution of the POC-CCA results in individuals from an endemic area classified as negative (n = 116) or positive (n = 112) for *S. mansoni* infection by extensive parasitological testing (Reference standard: 18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helminthex); total n = 228). Data indicate the percentages of POC-CCA reactivities in each group of parasitologically negative or positive individuals. Red circles indicate discordant results in comparison with the reference standard (false positive: 28 and 2%; or false negative: 35%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.g005>

agreement with the results of the other parasitological exams. The results were classified as trace, weak (+), medium (++) or strongly positive (+++) in 43 (38%), 17 (15%), 10 (9%), and three (3%) of the examined urine samples, respectively (Fig 5B). In contrast, 39 urine samples (35%) from egg-positive individuals were not reactive in the urine test and, therefore, were misclassified as uninfected (false negatives). Interestingly, the mean EPG value from these misclassified individuals was considered as very low (mean EPG: 4.3; minimum: 1 EPG, maximum: 36 EPG).

Out of the 73 samples that were positive according to the reference standard and in the POC-CCA, 59 (81%), 10 (14%), and four (5%) individuals were considered to have a light, moderate or high parasite load, respectively. A significantly positive correlation was found between the scores of the POC-CCA and intensity of infection, as determined by individual EPG values ($R = 0.537$; $p = 0.0001$). The agreement between POC-CCA and the reference standard, as the sum of all parasitological exams, showed a low concordance ($\kappa = 0.34$), which was even lower when trace results in the urine test were considered as a negative result ($\kappa = 0.25$) (see also Table 5).

Combination of methods for an improved diagnosis of intestinal schistosomiasis

Since the KK method is the recommended technique for the diagnosis of intestinal schistosomiasis [14], we compared the combination of more KK slides and fecal samples with the

Table 6. Prevalence, sensitivity and specificity of different diagnostic tests when combined with the Kato-Katz method, as compared with the reference standard (18 Kato-Katz slides, saline gradient, and Helminthex).

Combination of Diagnostic Methods	Prevalence (%)	Combined sensitivity parallel tests (%)	Combined specificity parallel tests (%)
SPL1 K1-K2 + GRAD	27.8	67.6	100
SPL1 K1-K6 + GRAD	31.3	75.9	100
SPL1-3 K1-K2 + GRAD	40.1	81.6	100
SPL1 K1-K2 + HTX	45.4	90.0	100
SPL1 K1-K6 + HTX	48.7	92.5	100
SPL1-3 K1-K2 + HTX	56.9	94.3	100
SPL1 K1-K2 + POC-CCA*	48.4	79.4	69.3
SPL1 K1-K2 + POC-CCA**	33.0	57.1	98.3
SPL1 K1-K6 + POC-CCA*	54.1	84.7	69.3
SPL1 K1-K6 + POC-CCA**	39.3	68.1	98.3
SPL1-3 K1-K2 + POC-CCA*	60.3	88.3	69.3
SPL1-3 K1-K2 + POC-CCA**	46.6	75.6	98.3

The Kato-Katz method with an increasing number of slides or fecal samples was combined with the saline gradient (GRAD), Helminthex (HTX) and the rapid urine test (POC-CCA). Rapid urine test (POC-CCA) with trace results considered positive(*) and trace results considered negative(**).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232.t006>

modified Helminthex method, saline gradient, and the rapid urine test (POC-CCA). The combination of two KK slides from one fecal sample (1SPL K1-K2) with Helminthex or of six slides from three fecal samples (SPL1-3 K1-K2) with POC-CCA resulted in the highest prevalence rates (45.4% and 60.3%) and highest sensitivity rates (90.0% and 88.3%) (Table 6). Looking for easily applicable diagnostic methods with improved sensitivity for epidemiological studies, we found that the combination of the KK method with the POC-CCA test produced better results when the number of slides and fecal samples was increased (Table 6).

Discussion

Human schistosomiasis is still considered a parasitic infection with global health impact as it affects about 250 million people in 78 countries and more than 700 million individuals are estimated to live at risk of infection [3,4,16]. In the Americas, the only schistosome species is *S. mansoni* and recent estimates indicated about 1.8 million infected individuals and approximately 25 million people living at risk of infection, with most of the cases occurring in Brazil [9]. In Brazil, transmission of schistosomiasis occurs in 19 states with a larger presence in the northeastern states as well as Minas Gerais, and Espírito Santo [41]. Recent data released by the Brazilian Ministry of Health in 2012 indicated a positivity rate of 4.5% of examined individuals residing in the endemic areas covered by the National Program for Schistosomiasis Control [42].

The large-scale parasitological screening, individual diagnosis, and ongoing treatment with praziquantel promoted by the NPSC led to a considerable reduction of infection rates, severe clinical cases, and transmission of *S. mansoni* in endemic areas [21, 42]. For field-based diagnosis, the recommended tool for the detection of intestinal schistosomiasis is the KK thick-smear method [13], which detects schistosome eggs in two KK slides from one fecal sample [14]. However, it has been shown, in different endemic settings, that this technique is not sensitive enough to detect schistosomiasis in individuals with low parasite burden [17,25,43–47], being even less sensitive when only one KK slide was examined, as usually occurs during the interventions promoted by the NPSC [12,19,20]. Thus, the Brazilian Ministry of Health recommends the examination of a higher number of KK slides in areas where the parasite burden is supposed to be low [42].

In the present study, we tested the sensitivity of an increasing number of KK slides using up to three fecal samples and compared its performance with other parasitological methods in an area endemic for intestinal schistosomiasis. By performing thorough parasitological exams, we aimed to get close to the ‘real’ picture of *S. mansoni* infections in this endemic region, which is located within the area of action of the NSPC, but had not suffered any intervention in the two years before the beginning of the present study. The diagnostic effort presented herein allowed us to evaluate different parasitological methods in the light of a strong reference standard, uniquely defined in this study.

Most of the population from the rural area studied herein had no adequate water supply and sanitation. While waterborne protozoan infections were common, other intestinal helminth infections were less frequent. *S. mansoni* infection was initially estimated to be 20.4%, after examination of two KK slides from one fecal sample, which led the area to be classified as with moderate risk of infection [48]. The classification of infected individuals according to their parasite load [14] confirmed that two thirds of the initially diagnosed individuals harbored a light *S. mansoni* infection and less than 10% had a heavy infection. After performing additional KK slides and other parasitological methods, the prevalence rose to 45.9%, which represented a 2.3 times increase when compared with the initial exams and indicated nearly half of the examined population as infected. As revealed by previous studies in areas of low transmission of *S. mansoni* [12,19,20,25], the prevalence of infection for this parasite in the area studied herein was largely underestimated when only the standard KK method was used. The prevalence profile for intestinal schistosomiasis in different age groups revealed herein matched that from other studies [4, 49,50]. However, if the standard method of two KK slides was compared with our reference standard (18 KK slides + saline gradient + Helmintex), we identified up to 4.7 times higher prevalences in the different age groups. This is in line with results published previously [19, 20], showing that an increase in the number of examined KK slides considerably augmented the number of egg-positive individuals. However, and this goes beyond the already existing data on the evaluation and performance of multiple KK slides, we showed that even using the superior version of the KK technique, which involves analyzing two slides from three different fecal samples, we still missed more than one third of the infected population.

Besides the KK technique, the other parasitological tests composing our reference standard included a saline gradient using 500 mg of fecal matter from the first fecal sample [23] and performed modified Helmintex method [38], which used up to 30 grams of feces. Using these methods, a considerable number of additional egg-positive individuals were detected, with the Helmintex method presenting the best performance and a sensitivity of over 80%. Initially, the Helmintex method was described of being 30 times more sensitive than the standard KK method [24], which is mainly due to the high amount of examined fecal matter, the successive sieving and concentration processes and the separation and distinction of eggs by paramagnetic beads and additional staining methods in the modified version [38]. A study investigating a low transmission area in the northeast of Brazil using the Helmintex method showed similar results to ours published [51]. However, it has to be emphasized that, in the present setting, none of the parasitological methods tested herein was able to detect eggs in every positive sample. In this context it is interesting to note, that in seeding experiments with 30 grams of feces, the recovery of schistosome eggs in fecal samples processed by the Helmintex method was about 27%, only [38]. Further, it was not the aim of the study to evaluate and compare the different methods in terms of applicability in field surveys, as well as operational, personnel, and logistics and other factors that influence their implementation, as stated by others [19, 52–54].

An interesting alternative to the time consuming and labor intensive parasitological methods are rapid immunochromatographic tests for circulating antigens. Therefore, we included the commercialized rapid urine test (POC-CCA) [28] in our study and evaluated it in comparison with our parasitological reference standard. The POC-CCA has shown promising results for the detection of intestinal schistosomiasis in various settings in Africa and Asia [32–34, 55,56]. When the *S. mansoni* egg-positive individuals tested herein were classified according to their parasite load, the parasitological tests and the POC-CCA readily detected the individuals with heavy or moderate infections. In contrast, all tests (parasitological and the POC-CCA) showed reduced sensitivities when individuals with a low (99–12 EPG) or very low (less than 12 EPG) parasite load had to be detected. Especially in the case of very low parasite load, the KK technique, at its best, only detected 40% of the infected individuals. In the case of the individuals with very low parasite load, the POC-CCA and the Helmintex methods showed the best performance with sensitivities of more than 50 and 84%, respectively.

The rapid urine test (POC-CCA) has been successfully tested in different regions of Africa and Asia [32,34, 56–58] and there are initiatives which favor this test for screening and mapping of intestinal schistosomiasis and improve transmission control and the elimination of schistosomiasis [59,60]. However, the epidemiological situation of intestinal schistosomiasis in most areas in Brazil is different from that found in many endemic settings in other tropical countries. This is probably because the country has a national program for schistosomiasis control since the 1970s with regular intervals of diagnosis and treatment rounds in endemic populations. Data from the Brazilian Ministry of Health [42] and risk mapping of schistosomiasis in the country [61–63] indicated a considerable decrease in infection rates and high prevalence risk areas with ongoing interventions [42, 63]. However, these claims might be overly optimistic since they are based on data from one KK slide from one fecal sample. In any case, according to the government-published data, as a result of the NPSC interventions, the parasite burden, significant morbidity, and mortality rates decreased during the last two decades [42]. We evaluated the performance of POC-CCA and compared it with the reference standard to detect *S. mansoni* infection in individuals of a community where NPSC's interventions including varying rounds of treatment had been promoted. The POC-CCA showed a sensitivity of approximately 65%, which is superior to that obtained with the saline gradient method, comparable with the results obtained with KK variant using six KK slides from three fecal samples, and inferior to the sensitivity found with Helmintex, when the criteria of evaluation were used as indicated by the manufacturer that is, if 'trace' was considered a positive result. A similar result for the sensitivity of POC-CCA and comparison with the performance of multiple KK smears was obtained in an endemic area in Africa [64]. In our study, the main shortcoming of the rapid urine test (POC-CCA) was a low concordance with the reference standard, since we found 30 and 35% of false positive and false negative results, respectively. This low concordance for the rapid urine test was not observed in other studies where parasitological efforts for detection of schistosome eggs in feces were far less rigorous [35, 65]. Also, the discrepancy might be partially explained by the discontinuous distribution of eggs in the fecal matter, intermittent egg excretion, a small number of female worms, or by occult infections with just one sex or aging worms. This is somewhat expected in elderly individuals since they rarely visit contaminated water streams and are, therefore, less prone to reinfection [32,43,46,66,67]. If 'trace' was not considered as positive, then the specificity increased to more than 98%, but the sensitivity dropped to less than 27%, which we consider insufficient for a screening method. In a recent study, the performance of POC-CCA was compared with that of a KK test with two slides of one fecal sample, as recommended by WHO, and without further extensive parasitological testing [65]. Even in that experimental setting, without a strong reference standard, the rapid urine test had a considerable percentage of false positive results, and

that occurred even for individuals from an area considered as non-endemic for schistosomiasis. Additionally, 14% were classified as negative by the urine test, but these were proven to be positive during parasitological exams [65]. Previous studies have reported cross-reactivity between schistosomes and other intestinal helminths or other clinical conditions that can lead to a false positive POC-CCA result [68–70]. However, we were not able to correlate any intestinal protozoan or helminth infection with a ‘trace’ or positive POC-CCA result.

In order to improve the performance of POC-CCA test and elucidate the situation of individuals who were tested as ‘trace’, prior concentration of urine by lyophilization significantly improved the concordance of the test in individuals with low parasite burden [70]. Also, recent investigations on the specificity and sensitivity of methods for the detection of circulating anodic antigen (CAA) from schistosomes seem to be even more promising [71–74].

To reach a maximum sensitivity and specificity and indicate alternatives for schistosomiasis control programs, we tried to combine the standard KK method and different modifications of this technique with the other parasitological methods or the POC-CCA. The best KK variant tested herein (six slides prepared from three fecal samples) achieved a sensitivity of 82, 88, and 94% when combined with the saline gradient, POC-CCA or Helmintex methods, respectively. Whether any of these scenarios is applicable to large-scale national control programs has to be carefully evaluated, considering logistic and economic aspects [54]. In any case, maybe a first parasitological test has to be combined with a second more specific test for schistosomiasis in order to join efforts against soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis [54,59,75]. Further, we believe that in areas of low endemicity or low intensity infections, serology or molecular biology, as proposed elsewhere [11,25,76–78], might be valuable alternatives to be included as additional diagnostic procedures. We are currently investigating the performance of molecular biological methods and serology in the parasitologically well-defined population studied herein.

In conclusion, we showed that in endemic areas of intestinal schistosomiasis with low-intensity infections, the actual prevalence can be underestimated by up to 4.7 times when measured by the recommended standard procedure. The rigorous parasitological testing of three fecal samples allowed us to evaluate parasitological and immunochromatographic methods for diagnosis of infection with *S. mansoni*. The KK technique, even at its best was able to detect only two-thirds of the infected individuals. The best sensitivity rate (over 80%) was achieved with the Helmintex method. However, in its present form, Helmintex is not applicable for large-scale screening due to the required sample size and the time-consuming sieving and sedimentation processes [38], but might be an adequate reference standard or gold standard for the evaluation of newly developed, field-based diagnostic tools. In addition, the performance of the POC-CCA was in the range of the best KK variant (six slides from three fecal samples), but a high number of individuals were not correctly diagnosed (false positive or false negative). Furthermore, studies are underway, in order to re-evaluate the use of standard serological methods and PCR-based detection of parasite DNA with our well-defined biological samples. We believe that a combination of methods has to be implemented since the schistosomiasis control programs in different regions of the world are moving from morbidity control towards transmission control and elimination.

Supporting information

S1 Fig. Geographical localization of Minas Gerais State within Brazil (small red window) and localization of the endemic area in the Municipality of Januária, northern region of Minas Gerais (zoom). Source: https://pt.wikipedia.org/wiki/Janu%C3%A1ria#/media/File:MinasGerais_Municip_Januaria.svg. (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank the people from the communities Pé da Serra, Tocantins, and Santana for their collaboration and the warm reception during the field activities. We are also thankful to the municipal government of Januária for the logistic support during the field studies and to Mr. Adailton Viana Bitencourt and the technicians from the Schistosomiasis Control Program for their valuable help.

Author Contributions

Conceptualization: Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Data curation: Warlem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Martin Johannes Enk, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Formal analysis: Warlem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Funding acquisition: Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Investigation: Warlem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Methodology: Warlem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Frederico Gil, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Project administration: Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Resources: Carlos Graeff-Teixeira, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Supervision: Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Validation: Warlem Junio Oliveira, Fernanda do Carmo Magalhães, Andressa Mariana Saldanha Elias, Vanessa Normandio de Castro, Vivian Favero, Catieli Gobetti Lindholz, Áureo Almeida Oliveira, Fernando Sergio Barbosa, Frederico Gil, Carlos Graeff-Teixeira, Martin

Johannes Enk, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Visualization: Paulo Marcos Zech Coelho, Stefan Michael Geiger.

Writing – original draft: Warlem Junio Oliveira, Maria Aparecida Gomes, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

Writing – review & editing: Fernanda do Carmo Magalhães, Carlos Graeff-Teixeira, Martin Johannes Enk, Paulo Marcos Zech Coelho, Mariângela Carneiro, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, Stefan Michael Geiger.

References

- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(9):e300. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300> PMID: 18820747
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human Schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368 (9541):1106–1118. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3) PMID: 16997665
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6 (7):411–425. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7) PMID: 16790382
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014; 383(9936):2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2) PMID: 24698483
- van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop*. 2003; 86(2–3): 125–139. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00029-9) PMID: 12745133
- Katz N, Peixoto SV. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(3):303–8. <https://doi.org/10.1590/S0037-8682200000300009> PMID: 10967599
- Passos ADC, Amaral RS. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31 (2 Suppl): S61–74.
- Scholte RG, Gosoni L, Malone JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop*. 2014; 132: 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.007> PMID: 24361640
- Noya O, Katz N, Pontier JP, Theron A, Noya BA. Schistosomiasis in America. In: Franco-Paredes C, Santos-Preciado JI, editors. *Neglected tropical diseases: Latin America and the Caribbean*. Viena: Springer; 2015. pp. 11–43.
- Rabello A, Pontes LA, Enk MJ, Montenegro SML, De Moraes CNL. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, editors. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. pp. 895–926.
- Grenfell R, Ham DA, Tundup S, Da'Dara A, Siqueira L, Coelho PMZ. New approaches with different types of circulating cathodic antigen for the diagnosis of patients with low *Schistosoma mansoni* load. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(2):e2054. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002054> PMID: 23469295
- Siqueira LMV, Gomes LI, Oliveira E, Oliveira ER, Oliveira AA, Enk MJ, et al. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110:209–214. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140375> PMID: 25946244
- Katz N, Chaves A, Pellegrino JA. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1972; 14 (6): 397–400.
- World Health Organization (2002). Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis. Technical Series Report 912. Available: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_912.pdf.
- Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol*. 2004; 20:35–39. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.019> PMID: 14700588

16. World Health Organization. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012; 87: 37–44. PMID: [22308580](#)
17. de Vlas SJ, Gryseels B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitol Today.* 1992; 8 (8):274–77. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90144-Q](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90144-Q) PMID: [15463638](#)
18. Gryseels B. Uncertainties in the epidemiology and control of schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55 (5 Suppl): S103–108.
19. Enk MJ, Lima ACL, Drummond SC, Schall VT, Coelho PMZ. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Trop.* 2008; 108 (2–3):222–228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.016> PMID: [18973744](#)
20. Siqueira LM, Coelho PM, Oliveira AA, Massara CL, Carneiro NF, Lima AC, et al. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(7):844–50. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000700010> PMID: [22124557](#)
21. Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101(1 Suppl): S79–85.
22. Sarvel AK, Oliveira AA, Silva AR, Lima AC, Katz N. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3):e990. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000990> PMID: [21423644](#)
23. Coelho PMZ, Jurberg A, Oliveira AA, Katz N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (5): 720–723. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000500010> PMID: [19820832](#)
24. Teixeira CF, Neuhauss E, Bem 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; 14; 1(2):e73. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000073>
25. Gonçalves MML, Barreto MGM, Peralta RHS, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja RP, et al. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Trop.* 2006; 100 (1–2): 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.09.004> PMID: [17069742](#)
26. Jin YM, Lu K, Zhou WF, Fu ZQ, Liu JM, Shi YJ, et al. Comparison of recombinant proteins from *Schistosoma japonicum* for schistosomiasis diagnosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17:476–480. <https://doi.org/10.1128/CVI.00418-09> PMID: [20053872](#)
27. Espírito-Santo MC, Alvarado-Mora MV, Dias-Neto E, Botelho-Lima LS, Moreira JP, Amorim M, et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:558. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0558-4> PMID: [25338651](#)
28. van Dam GJ, Wichers JH, Ferreira TMF, Ghati D, van Amerongen A, Deelder AM. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (12):5458–5461. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5458-5461.2004> PMID: [15583265](#)
29. De Clercq D, Sacko M, Verduyck J, Bussche V, Landouré A, Diarra A, et al. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections in Office du Niger, Mali. *Trop Med Int Health.* 1997; 2 (7): 680–685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1997.d01-354.x> PMID: [9270735](#)
30. Disch J, Garcia MM, Krijger GW, Amorim MN, Katz N, Deelder AM, et al. Daily fluctuation of levels of circulating cathodic antigen in urine of children with *Schistosoma mansoni* infection in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91 (2):222–225. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(97\)90233-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(97)90233-9) PMID: [9196777](#)
31. Polman K, Engels D, Fathers L, Deelder AM, Gryseels B. Day-to-day fluctuation of schistosome circulating antigen levels in serum and urine of humans infected with *Schistosoma mansoni* in Burundi. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59(1):150–154. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.150> PMID: [9684644](#)
32. Stothard JR, Kabatereine NB, Tukahebwa EM, Kazibwe F, Rollinson D, Mathieson W, et al. Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. *Acta Trop.* 2006; 97(2): 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.11.004> PMID: [16386231](#)
33. Standley CJ, Lwambo NJ, Lange CN, Kariuki HC, Adriko M, Stothard JR. Performance of circulating cathodic antigen (CCA) urine-dipsticks for rapid detection of intestinal schistosomiasis in schoolchildren from shoreline communities of Lake Victoria. *Parasit Vectors.* 2010; 3(1):7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-7> PMID: [20181101](#)
34. Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tchuem Tchuente LA, N'Goran EK, et al. 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](#)

35. Coulibaly JT, N'Goran EK, Utzinger J, Doenhoff MJ, Dawson EM. A new rapid diagnostic test for detection of anti-*Schistosoma mansoni* and anti-*Schistosoma haematobium* antibodies. *Parasit Vectors*. 2013; 6:29. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-29> PMID: 23360734
36. 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):605–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0725> PMID: 26755565
37. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *PR J Publ Hlth Trop Med*. 1934; 9: 283–298.
38. Favero V, Candido RR, Verissimo CM, Jones MK, Pierre TG, Lindholz CG, et al. Optimization of the Helminx method for schistosomiasis diagnosis. *Exp Parasitol*. 2017; 177: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.001> PMID: 28431921
39. Midzi N, Butterworth AE, Mduluzi T, Munyai S, Deelder AM, van Dam GJ. Use of circulating cathodic antigen strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(1):45–51. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.08.018> PMID: 18951599
40. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1): 159–174. <https://doi.org/10.2307/2529310> PMID: 843571
41. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (5 Suppl):S13–19. <https://doi.org/S0074-02762004000900003>
42. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde (2014). Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas. 4. ed. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília, p.146, 2014. Available: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf.
43. Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54(4):319–24. PMID: 8615440
44. De Vlas SJ, Engels D, Rabello AL, Oostburg BF, van Lieshout L, Polderman AM, et al. Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. *Parasitology*. 1997; 114 (2): 113–121. <https://doi.org/10.1017/S0031182096008207>
45. Utzinger JN, Goran EK, Dri A, Lengeler C, Tanner M. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. *Trop Med Int Health*. 2000; 5(2): 771–778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00646.x>
46. Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*. 2004; 92 (3): 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.06.011> PMID: 15533288
47. Lin DD, Liu JX, Liu YM, Hu F, Zhang YY, Xu JM, et al. Routine Kato–Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: A case study in an endemic area of the People's Republic of China. *Parasitol Int*. 2008; 57 (3): 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.04.005> PMID: 18485807
48. World Health Organization. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012; 87(4): 37–44. PMID: 22308580
49. Coura-Filho P, Farah MW, Rezende FD, Lamartine SS, Carvalho OS, Katz N. Environmental and social determinants in schistosomiasis mansoni in Ravena, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saude Pública*. 1995; 11 (2): 254–265. PMID: 14528332
50. Fleming FM, Brooker S, Geiger SM, Caldas IR, Correa-Oliveira R, Hotez PJ, et al. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(1):56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01541.x> PMID: 16398756
51. 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 Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(7):873–876. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000700006> PMID: 23147142
52. Teles HM, Ferreira CS, Carvalho ME, Zacharias F, Magalhães LA. The efficiency of the examination of compressed fecal samples for *Schistosoma mansoni* eggs. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(4):503–507. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000400012> PMID: 12937729
53. Speich B, Knoop S, Mohammed KA, Komis IS, Rinald L, Cringoi G, et al. Comparative cost assessment of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for soil-transmitted helminth diagnosis in epidemiological surveys. *Parasit Vectors*. 2010; 3(71). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-71>
54. Turner HC, Betis AA, Dunn JC, Whitton JM, Hollingsworth TD, Fleming FM, et al. Economic considerations for moving beyond the Kato-Katz technique for diagnosing intestinal parasites as we move

- towards elimination. *Trends Parasitol.* 2017; 33(6): 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.01.007> PMID: [28187989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187989/)
55. Sousa-Figueiredo JC, Betson M, Kabatereine NB, Stothard JR. The urine circulating cathodic antigen (CCA) dipstick: a valid substitute for microscopy for mapping and point-of-care diagnosis of intestinal schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 7 (1): e2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002008> PMID: [23359826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23359826/)
 56. Cai YC, Xu JF, Steinmann P, Chen SH, Chu YH, Tian LG, et al. Field comparison of circulating antibody assays versus circulating antigen assays for the detection of schistosomiasis japonica in endemic areas of China. *Parasit Vectors.* 2014. 7: 138. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-138> PMID: [24684924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24684924/)
 57. Stothard JR, Webster BL, Weber T, Nyakaana S, Webster JP, Kazibwe F, et al. Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni* in Uganda: DNA barcoding reveals substantive genetic diversity within Lake Albert and Lake Victoria populations. *Parasitology.* 2009; 136:1–12. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005167>
 58. Tchuem Tchuente LA, Fouodo CJ, Ngassam RI, Sumo L, Noumedem CD, Kenfack CM, et al. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(7):e1758. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001758> PMID: [22860148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22860148/)
 59. Hawkins KR, Cantera JL, Storey HL, Leader BT, Santos T. Diagnostic tests to support late-stage control programs for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(12): e0004985. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004985> PMID: [28005900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28005900/)
 60. Tchuem Tchuente LA, Rollinson D, Stothard JR, Molyneux D. Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. *Infect Dis Poverty.* 2017; 6 (42). <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0256-8>
 61. Guimarães RJ, Freitas CC, Dutra LV, Scholte RG, Martins-Bedé FT, Fonseca FR, et al. A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(4):524–31. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000400030> PMID: [20721503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20721503/)
 62. Guimarães RJ, Freitas CC, Dutra LV, Moura AC, Amaral RS, Drummond SC, et al. Schistosomiasis risk estimation in Minas Gerais State, Brazil, using environmental data and GIS techniques. *Acta Trop.* 2008; 108(2–3):234–41. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.001> PMID: [18692017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18692017/)
 63. Scholte RG, Gosoni L, Malone JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop.* 2014; 132: 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.007> PMID: [24361640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24361640/)
 64. Lambertson PH, Kabatereine NB, Oguttu DW, Fenwick A, Webster JP. Sensitivity and specificity of multiple Kato-Katz thick smears and a circulating cathodic antigen test for *Schistosoma mansoni* diagnosis pre- and post-repeated-praziquantel treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(9):e3139. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003139> PMID: [25211217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25211217/)
 65. Silveira AMS, Costa EGD, Ray D, Suzuki BM, Hsieh MH, Fraga LA, et al. 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26752073/)
 66. Barreto ML, Smith DH, Sleigh AC. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84 (4): 545–555.
 67. Rabelo ALT. Revisão crítica dos métodos de diagnóstico da esquistossomose mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994; 27(4 Suppl): 177–180.
 68. Van Dam GJ, Bergwerff AA, Thomas-Oates JE, Rotmano JP, Kamerling JP, Vliegenthart JF, et al. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. *Eur J Biochem.* 1994; 225(1):467–482. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00467.x> PMID: [7925469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7925469/)
 69. van Dam GJ, Claas FH, Yazdanbakhsh M, Kruize YC, van Keulen AC, Ferreira ST, et al. *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood.* 1996; 88(11):4246–4251. PMID: [8943860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8943860/)
 70. Coelho PM, Siqueira LM, Grenfell RF, Almeida NB, Katz N, Almeida Á, et al. 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27326453/)
 71. Corstjens PL, van Lieshout L, Zuidewijk M, Kornelis D, Tanke HJ, Deelder AM, et al. Up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen in serum. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(1): 171–176. <https://doi.org/10.1128/JCM.00877-07> PMID: [17942645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942645/)

72. van Dam GJ, de Dood CJ, Lewis M, Deelder AM, van Lieshout L, Tanke HJ, et al. A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen. *Exp Parasitol*. 2013; 135(2):274–282. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.017> PMID: [23850995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23850995/)
73. Corstjens PL, De Dood CJ, Kornelis D, Wilson RA, Kauriuki TM, Nyakundi RK, et al. Tools for diagnosis, monitoring and screening of *Schistosoma* infections utilizing lateral-flow based assays and upconverting phosphor labels. *Parasitology*. 2014; 141(14): 1841–1855. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000626> PMID: [24932595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24932595/)
74. van Dam GJ, Xu J, Bergquist R, de Dood CJ, Utzinger J, Quin ZQ, et al. An ultra-sensitive assay targeting the circulating anodic antigen for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* in a low-endemic area, People's Republic of China. *Acta Trop*. 2015; 141:190–197. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.08.004> PMID: [25128703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128703/)
75. Lo NC, Lai YS, Dimitrios-Alexios KV, Bogoch I, Coulibaly JT, Bendavid E, et al. Assessment of global guidelines for preventive chemotherapy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: a cost-effectiveness modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16(9): 1065–1075. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30073-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30073-1) PMID: [27286968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27286968/)
76. Alarcón de Noya B, Ruiz R, Losada S, Colmenares C, Contreras R, Cesari IM, et al. Detection of schistosomiasis cases in low-transmission areas based on coprologic and serologic criteria: The Venezuelan experience. *Acta Trop*. 2007; 103(1): 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.04.018> PMID: [17606217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17606217/)
77. Cavalcanti MG, Silva LF, Peralta RHS, Barreto MG, Peralta JM. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. *Trends Parasitol* 2013; 29(2): 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.11.003> PMID: [23290589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23290589/)
78. Stothard JR, Stanton MC, Bustinduy AL, Sousa-Figueiredo JC, van Dam GJ, Betson M, et al. Diagnostics for schistosomiasis in Africa and Arabia: A review of present options in control and future needs for elimination. *Parasitology*. 2014; 141(14):1947–61. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001152> PMID: [25158604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25158604/)

ANEXO F - Artigo publicado no ano de 2018 na revista *PLOS Neglected Tropical Diseases*, colaboração com grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS.

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

Catieli 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 egg, 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 (epg-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 xg. 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 × 2.5 cm filter papers (24-µm pore) (UNIFIL, Brazil), identified, and kept for examination by optical microscopy

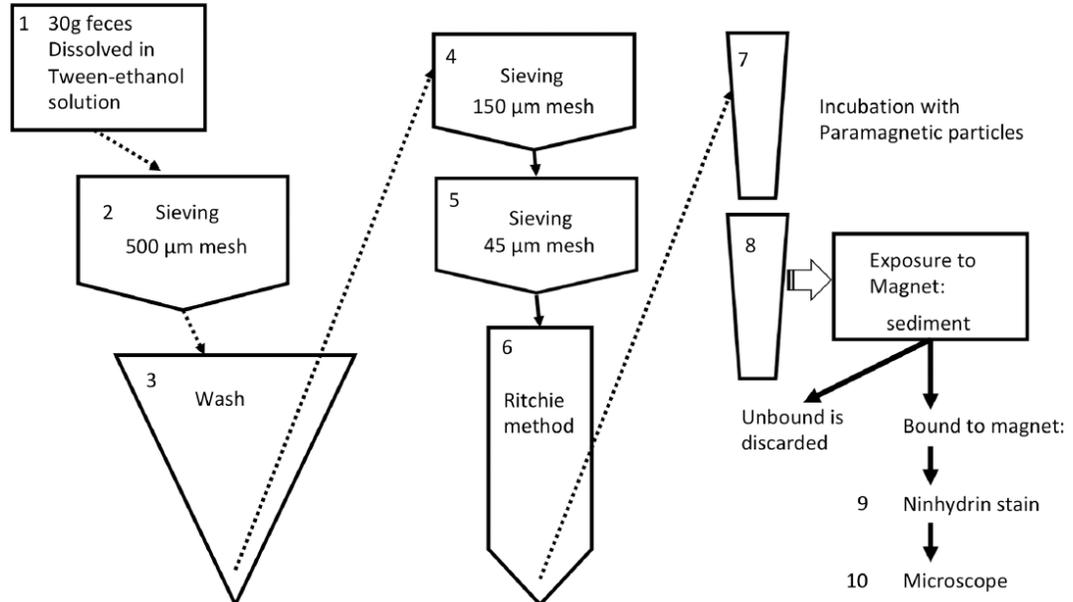


Fig 1. Schematic illustration of procedures in Helminthex method. It includes concentration steps from 1 to 8, followed by detection steps (9 and 10): ninhydrin staining and microscopic examination.

<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 epg of feces. Throughout the text “epg” 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 egg 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 egg values than KK (S1 Table).

POC-CCA band intensity partially correlates with egg burden when egg 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 $\text{epg} < 1$ samples subset. Within the $\text{epg} \geq 1$ group, there was an increase in the egg 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% ($\text{epg} < 1$) to 23.5% ($\text{epg} \geq 1$), while those with weak reactivity decreased from 71.9% ($\text{epg} < 1$) to 39.2% ($\text{epg} \geq 1$) (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 egg 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 Candeal, 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 Candeal, 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, Helminx 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>

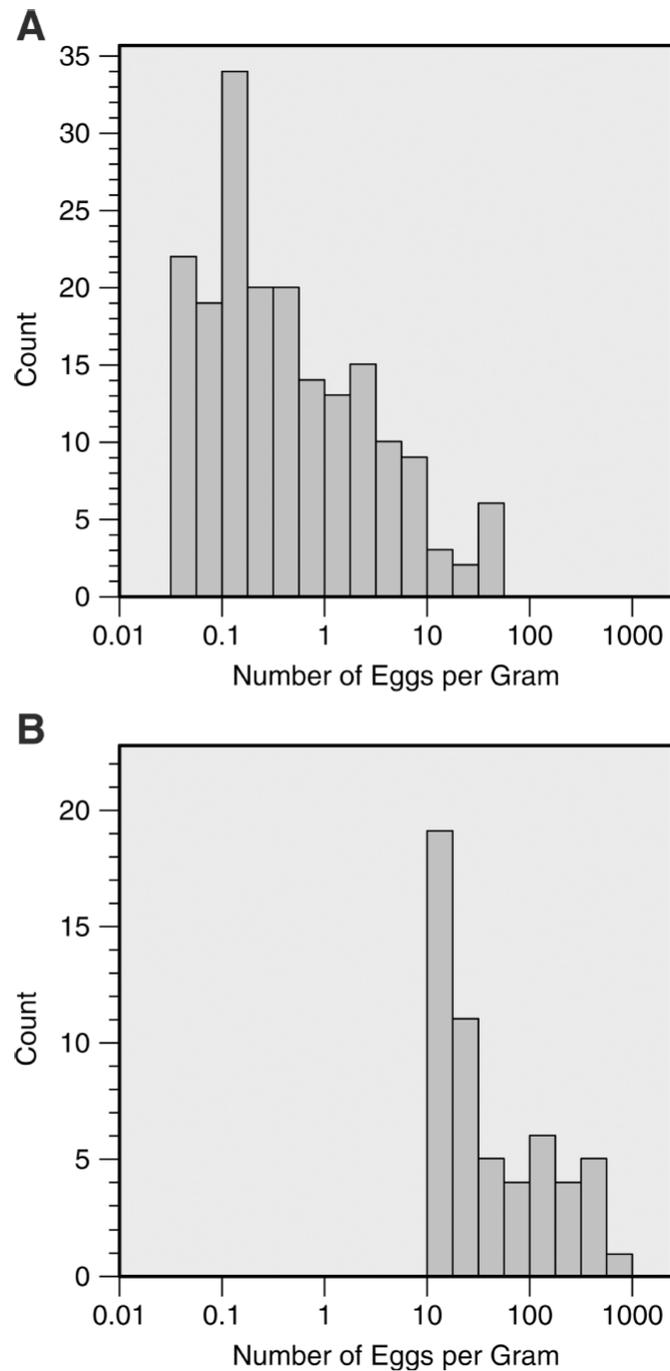


Fig 2. Egg counting by Helminex (HTX) and Kato-Katz (KK) methods. (A) Distribution of HTX-measured faecal egg burdens in the 187 subjects who tested positive and (B) distribution of the KK-measured faecal egg burdens in the 55 subjects who tested positive. Note the logarithmic scale on the horizontal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

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

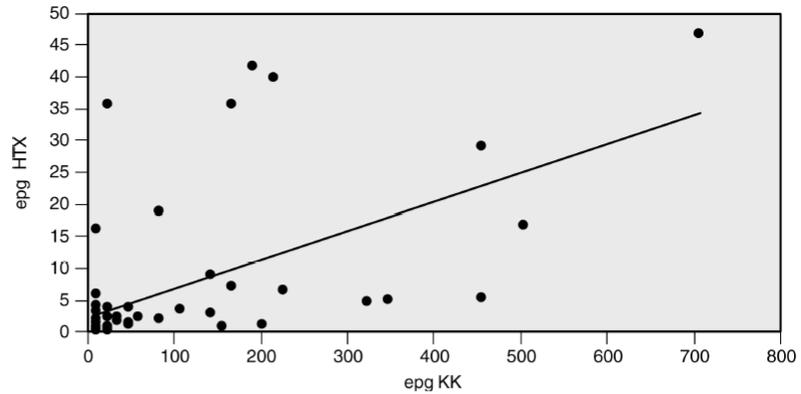


Fig 3. Case-to-case comparisons of the egg burden values estimated by the KK and HTX methods. Correlation coefficient is 0.5615 and 96% of the samples have higher epg values detected by the KK method.

<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 ≥1) and intensity of the reaction in 108 samples collected from Candeal, Estância, Sergipe, northeastern Brazil, November 2015.

Intensity	epg < 1			epg ≥ 1			Total	%
	n	%	Average		%	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 epg. 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 epg by the HTX method derives from absolute counting of eggs in 30 g of sample and the KK method estimates epg based on an extrapolation of egg counting in 42 mg of sample. Consequently, the latter potentially contributes to overestimated epg 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 epg 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 epg, 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 epg (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, Carmen 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 Helmintex 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, Schwaebler 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 Helmintex 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, Kabatereine 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28115675/)

ANEXO G – Imagens obtidas pelo grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, demonstrando fenômeno de agregação (*cluster*) em ovos de *S. mansoni*, durante manutenção de vermes *in vitro*.



Figura 25: Fenômeno de agregação de ovos de *S. mansoni*. Imagens obtidas por microscópio invertido de cultivo *in vitro* de vermes de *S. mansoni*, aumento 20x. Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS, 2014.

ANEXO H - Certificado de curso ministrado – Metodologia Helmintex



Porto Alegre, 13 de setembro de 2018

Declaração

Declaro que **Vivian Favero** participou do Treinamento sobre o Método Helmintex, como parte do Projeto Multicêntrico: “**Validação de Teste Diagnóstico de Urina POC-CCA (Antígeno Catódico Circulante) para detecção de esquistossomose em áreas de baixa endemicidade**”, de 10 a 14 de setembro do corrente ano, no Laboratório de Biologia Parasitária, Escola de Ciências da PUCRS, Porto Alegre, RS, na qualidade de ministrante e coordenadora das atividades. As atividades teórico-práticas somaram 30 horas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'carlos', is enclosed in a light gray rectangular box.

Professor Carlos Graeff Teixeira, MD, PhD

Coordenador, Laboratório de Biologia Parasitária

Escola de Ciências da PUCRS

Graeff.teixeira@gmail.com graeteix@puhrs.br

ANEXO I - Teste de quimiluminescência utilizando luminol desenvolvido pela LAPSE/UFRJ, com mensuração em Luminômetro.

Experimentos realizados no LAPSE/UFRJ em parceria com Prof. Claudio Cerqueira Lopes.

A mensuração da quimiluminescência foi realizada com Luminômetro (Hygiene[®]).

Teste de quimioluminescência Luminol-H₂O₂ com ovos de *Schistosoma mansoni*

1.0 Introdução.

A literatura relata várias formulações de detecção de sangue latente com base na reação de quimioluminescência do luminol. A primeira formulação destinada ao uso forense, GRODSKY et. al (1951), era formada por solução recém preparada contendo perborato de sódio, carbonato de sódio e Luminol. A instabilidade e baixa sensibilidade desta formulação estimularam o desenvolvimento de outras formulações destinadas ao uso forense, a mais citada pela literatura forense é formulação descrita por WEBER (1966). Associada a estas formulações também foram relatadas diferentes condições de análise e diferentes limites de sensibilidade. Segundo BARNI et. al. (2007), estas diferenças podem ser atribuídas às variações nas condições experimentais e dos métodos de preparo e utilização.

A formulação desenvolvida por WEBER (1966) tem o objetivo de realizar de forma direta o teste de detecção de resíduos de sangue na superfície suspeita, assim em local totalmente escurecido a visualização da luminescência de cor azul característica confirmaria a presença de resíduos hemáticos (**Teste visual**). No projeto Luminol desenvolvido no LASAPE (CHANTRE, 2014), bem como no ensaio com ovos de *Schistosoma mansoni* descritos neste documento, propusemos o emprego do luminol em um teste visual e em paralelo, a detecção da luminescência produzida pela reação de quimioluminescência em um luminômetro. Um equipamento de detecção de luminescência portátil que permite o emprego de metodologias qualitativas e semi-quantitativas da matéria orgânica (**Teste com luminômetro**).

O trabalho de tese desenvolvido neste projeto (CHANTRE, 2014) avaliou o desempenho do Luminol produzido no LASAPE e do padrão adquirido pela Sigma-Aldrich e os testes demonstraram que as duas amostras dos reagentes quando submetidas às mesmas condições produziram dois conjuntos de resultados estatisticamente iguais. Isto significa que as diferenças quanto às taxas de emissão (URL/s) são relativamente pequenas e as diferenças no grau de pureza dos dois produtos não é significativo para o seu emprego nos ensaios de quimioluminescência. Com base nestes resultados os ensaios de quimioluminescência com ovos de helmintos foram conduzidos empregando o Luminol produzido no LASAPE. As amostras foram submetidas à formulação desenvolvida por WEBER (1966) uma das mais difundidas na ciência forense.

Os mecanismos de catalise ou intensificação da reação de quimioluminescência promovidos pelos ovos dos helmintos não são conhecidos, desta forma para o controle de desempenho dos testes foram empregadas soluções com sangue humano diluído, uma vez que os efeitos catalíticos deste substrato sob a reação de quimioluminescência do Luminol são bastante difundidos na literatura (BARNI, 2007).

2.0- Objetivos

Avaliar de forma preliminar a empregabilidade do sistema quimioluminescente luminol-H₂O₂ na detecção de ovos de helmintos.

3.0- Resultados

3.1- Resultados do Teste visual

- Reagentes

50mg de Luminol em 100mL de solução de NaOH 0,1M em água ultrapura. - **Solução A**

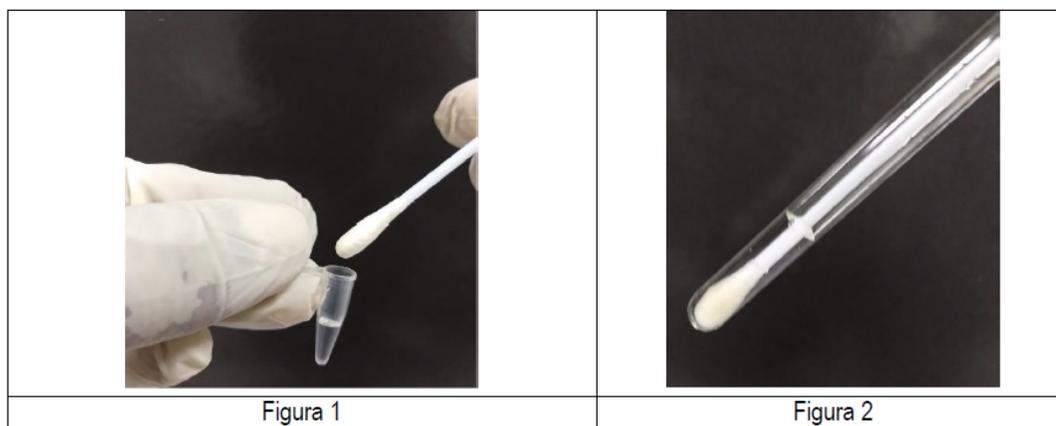
Solução de hemoglobina 150 ppm em água ultrapura (sangue humano diluição 1:10.000).- **Solução Ctrl**

Solução de H₂O₂ 3% em água ultrapura.- **Solução B**

- Preparo das amostras

Foram recebidas amostras rotuladas como: 25 e 50. Segundo a mensagem eletrônica recebida no dia 20/06/2018 o grupo de amostras rotuladas como 25 são tubos contendo 25 ovos obtidos de fígado de camundongo, diluídos em PBS 1X, pH neutro. E o grupo de amostras rotuladas como 50 são micro tubos contendo 50 ovos obtidos de fígado de camundongo, diluídos em PBS 1X, pH neutro.

- Amostras: O sistema de coleta e extração de matéria orgânica presente nos microtubos empregou de swabs que absorviam todo conteúdo dos microtubo (Figura 1). O conteúdo de cada microtubo foi absorvido por um swab que foi em seguida inserido em um tubo de ensaio contendo 1,0ml da Solução A (Figura 2).



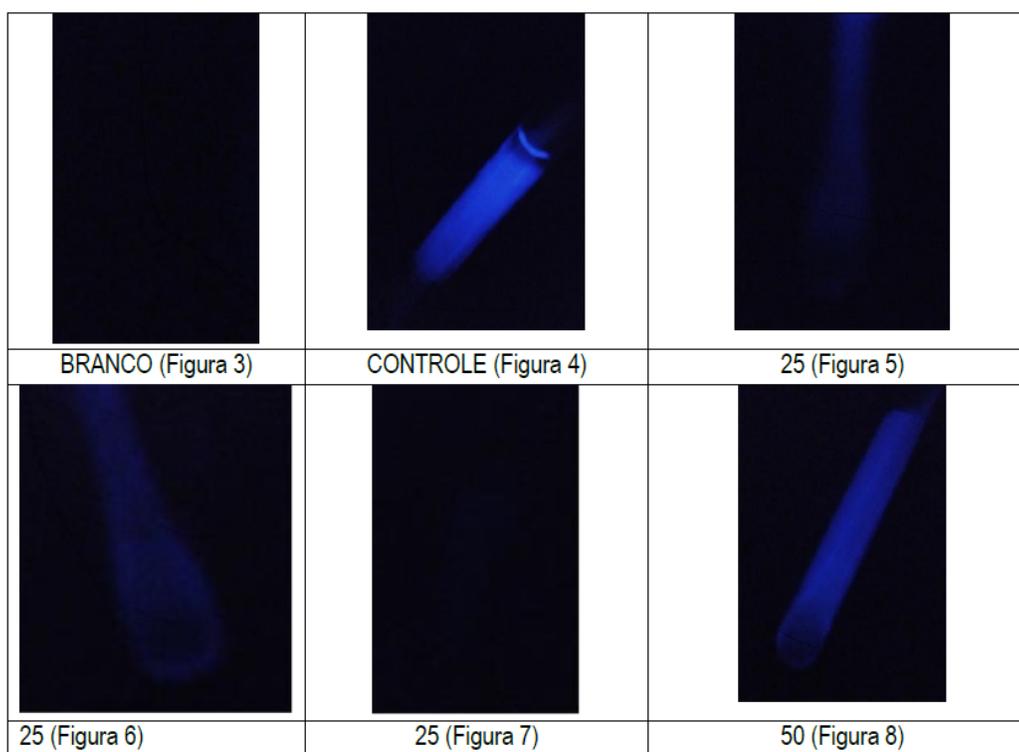
- Branco: 3 unidades de Swabs novos foram inseridos em 6 tubos e ensaio contendo 1,0ml da Solução A cada.

- Controle: 3 unidades de microtubo (capacidade de 2,0 ml) foram preenchidos com 0,5ml de Solução Ctrl. O conteúdo de cada microtubo foi absorvido por um swab que foi em seguida inserido em um tubo de ensaio contendo 1,0ml da Solução A.

Procedimento experimental

Em local escuro, com o auxílio de uma pipeta automática e ponteiros plásticos, foram transferidos 0,25ml da Solução B para cada um dos tubos, e observada a luminescência.

Resultados do Teste visual					
Legenda: (-) Resultado Negativo; (+) Resultado positivo fraco; (+ +) Resultado positivo médio; (+ + +) Resultado positivo forte					
Amostra	Resultado	Amostra	Resultado	Amostra	Resultado
BRANCO (Figura 3)	-	BRANCO	-	BRANCO	-
CONTROLE (Figura 4)	+++	CONTROLE	+++	CONTROLE	+++
25 (Figura 5)	+	25	+	50	+
25 (Figura 6)	-	25	+	50	+
25 (Figura 7)	-	50	+	50	+
25	+	50 (Figura 8)	+	50	+

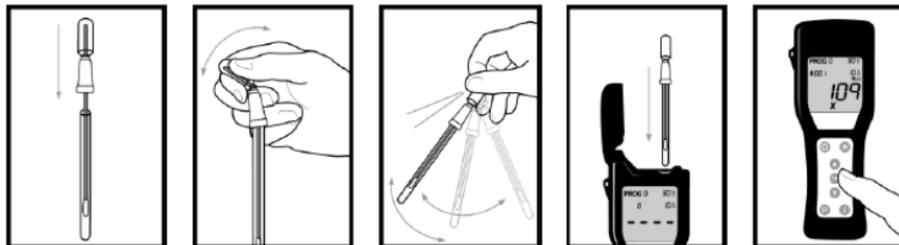


No teste de quimiluminescência visual, como já esperado, o branco não produziu luminescência enquanto o controle produziu forte quimiluminescência. O grupo de amostras rotuladas como 25 produziu luminescência muito fraca em alguns casos foram considerados negativos os resultados, já o grupo de amostras rotuladas como 50 produziu luminescência moderada.

- 3.2- Resultados do Teste com luminômetro

Neste trabalho foi empregado o sistema de monitoramento de sujidade da empresa Higiene @; o SystemSURE Plus munido do sistema de resíduos hemáticos desenvolvido pelo LASAPE no Projeto Luiminol (CHANTRE,2014) . Neste sistema, propõe-se detectar a presença de resíduos hemáticos em superfícies e também em líquidos, através

da quimioluminescência do Luminol. Quanto maior a quantidade de resíduo maior a quantidade de luz gerada. A luminosidade é detectada e amplificada por um fotomultiplicador no luminômetro e convertidos via software para unidades relativa de luminescência (URL).



As imagens acima foram extraídas do documento manual de uso do equipamento Hygiena © - SystemSURE Plus

O valor 1000 URL é o limite entre presença e ausência de resíduos hemáticos da metodologia e corresponde a amostras de sangue com diluições superiores a 1:10⁶. Assim o valor de 1000 URL é o “limite de corte” da leitura do sistema. Todos os valores entre 0 e 1000 URL são gerados por fatores internos do equipamento (quimioluminescência de fundo ou variações elétricas do aparelho. Nos resultados superiores a 1000 URL a luz foi gerada por uma fonte externa ao sistema do equipamento, portanto a presença de espécies capazes de catalisar e ou intensificar a reação de quimioluminescência do luminol.

- Reagentes

50mg do sólido (S_{Lum}) em 100mL de solução de NaOH 0,1M em água ultrapura. - **Solução A**

Solução de hemoglobina 150 ppm em água ultrapura (sangue humano diluição 1:10.000).- **Solução Ctrl**

Solução de H_2O_2 3% em água ultrapura.- **Solução B**

- Preparo das amostras e procedimento experimental

- Amostras: O sistema de coleta e extração de matéria orgânica presente nos microtubos empregou de swabs que absorviam todo conteúdo dos microtubo (Figura 1). O conteúdo de cada microtubo foi absorvido por um swab que foi em seguida inserido em um tubo de ensaio contendo 1,0ml da Solução A (Figura 2).
- Branco: 3 unidades de Swabs novos foram inseridos em 6 tubos e ensaio contendo 1,0ml da Solução A cada.
- Controle: 3 unidades de microtubo (capacidade de 2,0 ml) foram preenchidos com 0,5ml de Solução Ctrl. O conteúdo de cada microtubo foi absorvido por um swab que foi em seguida inserido em um tubo de ensaio contendo 1,0ml da Solução A.
- O luminômetro portátil foi acionado, em seguida aguardou-se 60 segundos para que fosse feita sua autocalibração.
- Retirou-se aleatoriamente um dos tubos de ensaio da estante e anotou-se sua identificação.
- O tubo foi imediatamente inserido no campo do equipamento reservado para o tubo de leitura e recebeu 0,25 ml da Solução B em seguida foi acionado a tecla de leitura.
- O valor de URL fornecido pelo aparelho e a identificação da amostra foram registrados.
- As etapas anteriores foram repetidas para todas as amostras e os resultados foram dispostos em uma tabela abaixo exposta na secção de resultados deste documento.

	BRANCO	AMOSTRA 25	AMOSTRA 50	CONTROLE
URL	297	1892	2776	6515
	228	2157	3043	6982
	371	2220	3231	7004
	674	2315	3440	7041
	781	2587	4101	7337
	853	2739	4727	7560
MEDIA	581,4	2318,3	3318,2	7073,2
DESV. PAD	269,9	305,5	501,2	355,6
DESV. PAD %	46,4	13,2	15,1	5,02

No teste de quimiluminescência com o luminômetro, como já esperado, o conjunto controle produziu luminescência forte e um conjunto de valores de URL coerente e preciso. Enquanto o conjunto branco produziu luminescência dentro do esperado pela metodologia, valores abaixo de 1000 URL, entretanto produziu um conjunto de resultados muito disperso.

No teste visual, o grupo de amostras rotuladas como 25 produziu luminescência muito fraca em alguns casos foram considerados negativos os resultados, já no teste com o luminômetro estas amostras produziram um conjunto de resultados imprecisos, no entanto eles estão claramente acima do limite corte da metodologia o que caracteriza uma resposta positiva e/ou a confirmação da presença de espécies capazes de catalisar a reação quimiluminescente do luminol.

No teste visual, o grupo de amostras rotuladas como 50 produziu luminescência moderada e neste resultado se confirmou no teste com luminômetro. As amostras 50 também produziram um conjunto de resultados imprecisos, no entanto eles estão claramente acima do limite corte da metodologia o que caracteriza uma resposta positiva e/ou a confirmação da presença de espécies capazes de catalisar a reação quimiluminescente do luminol.

4.0- Referencias Bibliográficas

BARNI, F. et. al.; Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection; *Talanta*, Vol. 72, pp896–913, 2007.

CHANTRE, L. G. F., *Processo de síntese do luminol em uma única etapa de reação. Produção de um kit luminol para ser usado no combate a contaminação hospitalar e na detecção de sangue oculto queimado*. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 237f. 2014.

LOPES, C. C. et. al.; *Hydrazines and derivatives production process from hydrazines and dicarboxylic acid*.(patente concedida em 14 de abril de 2009). United States patent, US 7,517,983; 14 Abr. 2009.

WEBER, K.; The use of chemiluminescence of Luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains, *Deutsche Zeitschrift für die Gesamte Gerichtliche Medizin*, Vol.57 (3), pp. 410–423, 1966.

ANEXO J - Declaração de avaliadora do Espaço Jovem Cientista, anos 2017 e 2018.



18º Salão de
Iniciação Científica

Espaço 
Jovem Cientista



DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a Me. Vivian Favero, participou como avaliadora, no **ESPAÇO JOVEM CIENTISTA 2017**, no período de 02 a 06 de outubro de 2017.

Porto Alegre, 06 de outubro de 2017.


Profa. Dra. Carla Denise Bonan
Pró-Reitora de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento



19º Salão de Iniciação Científica



DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a Professora Vivian Favero participou como avaliadora, no **ESPAÇO JOVEM CIENTISTA 2018**, no período de 02 a 05 de outubro de 2018.

Porto Alegre, 05 de outubro de 2018.

Profa. Dra. Carla Denise Bonan
Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação



ANEXO L - Colaborações

Nacionais:

- Dr^a. Alessandra L. Morassutti – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
- Dr. Stefan Michael Geiger - Universidade Federal de Minas Gerais;
- Dr. Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo - Universidade de Tiradentes-Sergipe;
- Dr. André Arigony Souto - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
- Dr. Martin Cancela - Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- Dr^a. Ângela Regina Piovesan - Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- Dr. Hélio Radke Bittencourt - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
- Dr. Fernanda Chiarello Stedile - Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- Dr. Claudio Cerqueira Lopes - Laboratório de Síntese e Análise de Produtos Estratégicos/ Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Internacionais:

- Dr. John P. Dalton - Queens University Belfast, Irlanda;
- Dr^a. Carolina DM. Veríssimo - Queens University Belfast, Irlanda;
- Dr. Malcolm K. Jones - University of Queensland e a University of Western Australia, Australia;
- Dr^a. Renata Russo Frasca Candido - University of Western Austrália, Crawley, Western Austrália, Austrália;
- Dr. Timothy G. St. Pierre - University of Western Australia, Crawley, Western Australia, Australia;



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