

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

Angélica da Paz Ramírez

**TRANSMISSÃO DE ESQUISTOSSOMOSE EM ESTEIO, RIO GRANDE DO
SUL: ATUALIZAÇÃO E EXPLORAÇÃO DE INDICADORES DA SUA
INTERRUPÇÃO.**

Porto Alegre – RS – Brasil

2016

Angélica da Paz Ramírez

**TRANSMISSÃO DE ESQUISTOSSOMOSE EM ESTEIO, RIO GRANDE DO
SUL: ATUALIZAÇÃO E EXPLORAÇÃO DE INDICADORES DA SUA
INTERRUPÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Co-orientadora: Dra. Renata Russo Frasca Candido

Porto Alegre – RS – Brasil

2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Alberto Ramírez Villasante. Obrigada pelo apoio, por me motivar, ser meu exemplo, meu melhor amigo. *Gracias papi, sin ti no soy nada*. A ti dedico esse trabalho. Eu te amo, obrigada!

À minha mãe, Roselaine Carral da Paz. És sem dúvida minha maior motivadora, aquela que não me deixa cair em nenhum momento. Obrigada pelo carinho diário, pelos momentos de risos e orações.

A minha irmã, Patricia da Paz Ramírez. Minha melhor amiga, a mais leal. Nossa parceria é eterna. Obrigada por ser quem tu és!

À minha sobrinha linda, Antônia. Minha maior felicidade, meu melhor sorriso, meus melhores momentos. Minha vida, eu te amo e vou sempre estar por perto.

À minha família felina, minhas doses diárias de carinho e amor.

Ao meu orientador professor Dr. Carlos Graeff-Teixeira, pela oportunidade, paciência, ensinamentos que vão muito além do trabalho acadêmico. Vou sempre carregar comigo todas as conversas e conselhos. Obrigada professor!

À minha co-orientadora Dr^a Renata Russo Frasca Candido, pela amizade, confiança, atenção e carinho. Aprendi e aprendo contigo sempre, e espero estar à altura de tuas expectativas e confiança.

À professora Dr^a Alessandra Morassutti, pela paciência inigualável, força nos momentos difíceis, ensinamentos, atenção. Serei sempre grata!

Ao professor Ricardo Falchi, por ser o professor mais especial que já tive. Por despertar em mim o amor pela vida acadêmica e pela parasitologia. Obrigada por me motivar e acreditar em mim.

As colegas e amigas do Laboratório de Parasitologia Biomédica da PUCRS: Carla Muller, Bianca Cognato, Joana Borges, Catieli Lindholz, Vivian Favero, Vanessa Fey e Carolina Veríssimo. Nunca conseguirei expressar o quanto vocês são importantes pra mim. Obrigada pela amizade, motivação, por aguentarem minhas inseguranças, e me incentivarem a não desistir. Obrigada pelas manhãs e tardes de risos e café.

À Unidade Básica de Saúde de Vila Pedreira, Esteio. Em especial à Elsa Simara da Silva Both, agente de saúde, pela ajuda e boa vontade.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho!

Muito Obrigada!

Resumo

A esquistossomose mansônica é uma infecção causada por um trematódeo, *Schistosoma mansoni*. No Brasil, as áreas de maior ocorrência são o norte de Minas Gerais e nordeste do país. Nos últimos anos, houve uma redução significativa na morbidade e prevalência desta infecção em algumas regiões. No entanto, a esquistossomose ainda é considerada uma doença parasitária em expansão geográfica. Em 1997, foi diagnosticado o primeiro caso autóctone em Esteio, no Rio Grande do Sul (RS). Desde então, 28 pessoas foram confirmadas com esquistossomose e monitoradas pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS. O objetivo deste estudo foi investigar e atualizar indicadores de interrupção da esquistossomose em Esteio, RS. Neste trabalho foram coletadas amostras de sangue de indivíduos ex-infectados por *S. mansoni* e de crianças em idade escolar de Vila Pedreira, Esteio. As crianças tiveram também coletadas amostras de urina. As amostras de sangue de foram analisadas pelo método de *Western-blot* (WB), utilizando o antígeno microssomal de *S. mansoni* (MAMA) e as urinas pelo teste rápido utilizando antígeno circulante catódico (POC-CCA). Resultados positivos foram confirmados pelo método Helmintex. 18 crianças tiveram resultado positivo para POC-CCA. Nestes casos os resultados da sorologia e do método Helmintex foram negativos. Existe a possibilidade de interrupção da transmissão da esquistossomose em Esteio, porém a certificação desta interrupção depende da continuidade por muito tempo, do monitoramento e ajuste dos métodos mais adequados para esta finalidade.

Palavras-chave: esquistossomose, baixa endemicidade, diagnóstico, interrupção da transmissão.

Abstract

Schistosomiasis is a trematode infection caused by *Schistosoma mansoni*. The parasitosis occurs mainly in northern Minas Gerais and northeastern States in Brazil. There has been a significant reduction in morbidity and prevalence of schistosomiasis in some areas. However, the parasitosis is still considered an infection that is expanding geographically. The first autochthonous case in Esteio, Rio Grande do Sul (RS) was diagnosed in 1997. Since that date, 28 individuals were found infected with *S.mansoni* and have been followed up by the Grupo de Parasitologia Biomédica at PUCRS. The objective of the present study was to investigate and update data indicating a possible interruption of transmission. Serum samples were collected from the individuals previously identified with the infection and from school-aged children at Vila Pedreira, Esteio. From children, urine samples were also collected and tested with the rapid test “point of care” for detection of cathodic circulating antigen (POC-CCA). Serum samples were examined by Western-blot (WB), with *S.mansoni* microsomal antigen (MAMA). 18 children were positive at POC-CCA test. None of the positive results with molecular methods were positive by Helmintex. Transmission interruption in Esteio may probably have occurred, but its certification needs a long-term monitoring as well as adjustment of best suited methods for this challenging task.

Key words: schistosomiasis, low endemicity, diagnosis, transmission interruption.

Lista de Figuras:

Figura 1: Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil no ano de 2002.....	04
Figura 2: Vermes de <i>S. mansoni</i> , observando-se a fêmea filiforme e parcialmente dentro do canal ginecóforo do macho.....	05
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i>	06
Figura 4: Vista aérea dos locais de residência dos 28 indivíduos com histórico de esquistossomose.....	23
Figura 5: Vista aérea das localidades de residência de indivíduos infectados, Vila Pedreira.....	24
Figura 6: Vista aérea das localidades de residência de indivíduos infectados, Novo Esteio.....	24
Figura 7: Vista aérea das localidades de residência de indivíduos infectados, Valo da Três Portos.....	25
Figura 8: Vista do fundo do VTP, junto à via férrea.....	25
Figura 9: Vista da frente da área do VTP, junto a BR-116.....	26
Figura 10: Área Casa dos Trilhos.....	26
Figura 11: Canal principal da Fazenda Kroeff.....	27
Figura 12: Vista da BR 448.....	27

Figura 13: Descrição dos resultados de exames realizados indivíduos diagnosticados com esquistossomose entre janeiro de 1997 e dezembro de 2015, em Esteio, Rio Grande do Sul.....	35
Figura 14: Demonstração dos caramujos aos alunos da escola Trindade, Vila Pedreira, Esteio.....	37
Figura 15: Demonstração de vermes e ovos aos alunos da escola Trindade, Vila Pedreira, Esteio.....	37
Figura 16: Alunos desenhando o que haviam aprendido durante a atividade.....	38
Figura 17: Desenhos dos alunos da escola Trindade após a atividade de educação em saúde.....	38

Lista de Tabelas:

Tabela I - Resumo de dados e evolução dos indivíduos com esquistossomose detectados entre janeiro 1997 e dezembro de 2015, em Esteio, Rio Grande do Sul.....	28
Tabela II - Distribuição dos 28 indivíduos ex-infectados quanto à localização original de residência.....	34
Tabela III – Distribuição dos 28 indivíduos ex-infectados quanto à localização atualizada de local de residência.....	34
Tabela IV- Resultados obtidos nas leituras do POC-CCA pelos diferentes examinadores.....	39
Tabela V - Resultado geral de todos os métodos aplicados.....	41
Tabela VI - Comparação dos métodos POC-CCA e Helmintex.....	43
Tabela VII - Comparação dos métodos POC-CCA e WB-MAMA.....	43
Tabela VIII - Comparação dos métodos Helmintex e WB-MAMA.....	43

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1.HISTÓRICO DA ESQUISTOSSOMOSE.....	02
1.2. <i>Schistosoma mansoni</i>	04
1.3.CICLO BIOLÓGICO.....	05
1.4.PATOGENIA.....	06
1.5.ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE.....	08
1.6.MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	10
1.6.1. MÉTODOS DIRETOS.....	10
1.6.2. MÉTODOS INDIRETOS.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1.OBJETIVO GERAL.....	16
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	51
7. REFERÊNCIAS.....	52
8. ANEXO.....	59
8.1.Artigo submetido a “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose, infecção causada por parasitos do gênero *Schistosoma*, é endêmica em países tropicais e subtropicais, e estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas estejam contaminadas e 700 milhões estão em risco de contaminação (WHO, 2015). Segundo dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em locais onde os programas de controle epidemiológico obtiveram sucesso, os índices de prevalência e intensidade de infecção diminuíram notavelmente, assim como as formas graves da doença (Rey, 2001). Existem três principais agentes dessa parasitose em humanos, são eles: *Schistosoma mansoni*, característico das Américas, África, Oriente Médio; *Schistosoma japonicum*, encontrado no Extremo Oriente, ambas espécies ocasionando a doença hepato-intestinal; *Schistosoma haematobium*, mais comum na África e Oriente Médio, causador da infecção genitourinária. Outras três espécies conhecidas por também causarem doença em humanos são o *Schistosoma mekongi*, que habita o sudeste asiático; *Schistosoma guineensis* e *Schistosoma intercalatum*, encontrados na África Ocidental e Central (Colley *et al.*, 2014).

Em 1847, os primeiros aspectos clínicos da esquistossomose foram relatados pelo japonês Fuji (Neves *et al.*, 2010), porém em 1852 o médico alemão Theodore Bilharz tornou-a conhecida durante necropsias feitas em um hospital do Cairo, onde ele observou um trematódeo de sexos separados associado a longas lesões intestinais que causavam disenteria (Prata, 2008). Desta maneira ele descreveu pela primeira vez a infecção que futuramente se chamaria esquistossomose (Carvalho *et al.*, 2008) e pelo fato de ter sido descrita primeiramente por Bilharz, esta infecção também é chamada de bilharziose (Neves *et al.*, 2010). Devido à fenda no corpo do verme macho, o nome de

origem grega *Schistosoma* (*schisto*= fenda; *soma*= corpo) foi sugerido por Weinland em 1858, e permanece aceito até os dias atuais (Prata, 2008). A espécie *Schistosoma mansoni* foi assim nomeada em 1907 por Sambon, que propôs esse nome devido à identificação de ovos de espículo lateral em fezes de um enfermeiro observadas por Patrick Manson em 1902, sugerindo uma nova espécie de *Schistosoma*. No Brasil, a espécie foi descrita detalhadamente em 1908 na Bahia por Pirajá da Silva (Katz, 2008).

Acredita-se que a chegada da esquistossomose no Brasil ocorreu com a vinda de imigrantes asiáticos e escravos africanos durante o período colonial. As condições favoráveis do clima e a existência de um hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*, permitiram a permanência do parasito em território nacional (Neves *et al.*, 2010). Os focos endêmicos no Brasil estão, em sua maioria, no nordeste e norte do país, principalmente Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia, Maranhão e também no norte de Minas Gerais. Existem também alguns pequenos focos de transmissão residual no Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Neto *et al.*, 2008). No estado gaúcho, o primeiro caso de transmissão autóctone ocorreu em Esteio, em 1997 e deste então, este foco vem sendo estudado pelo grupo de Parasitologia Biomédicas da PUCRS (Figura 1) (Graeff-Teixeira *et al.*, 1999).

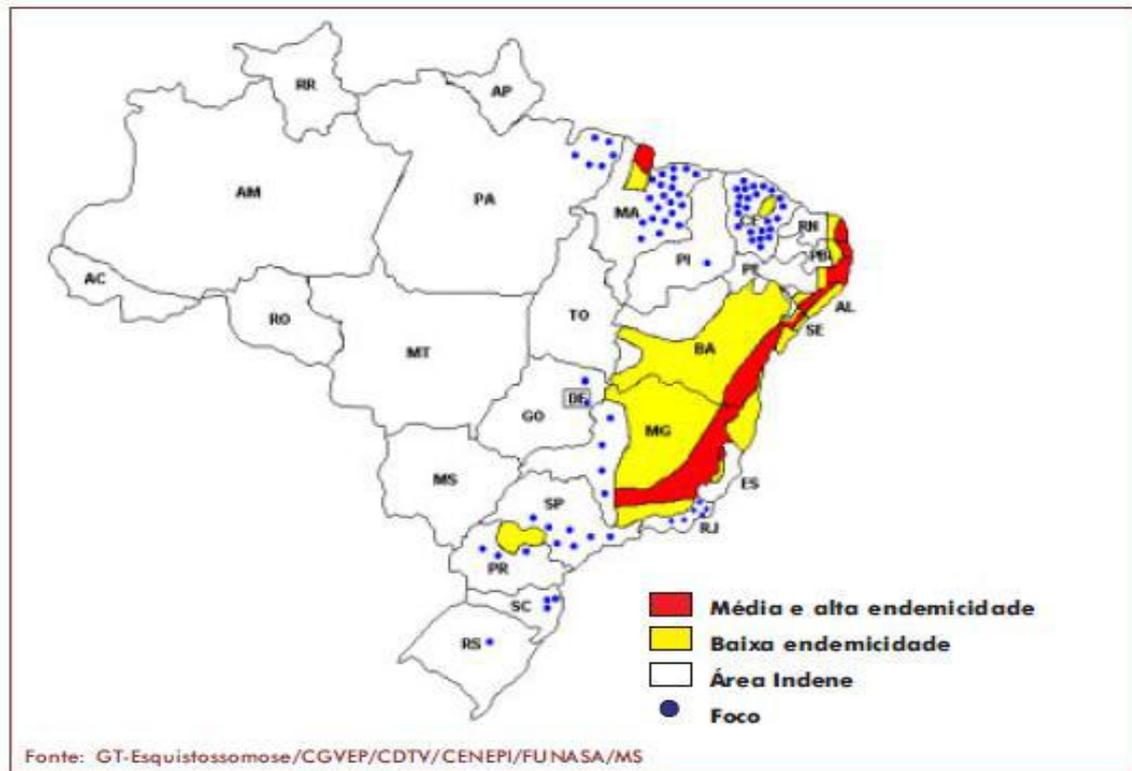


FIGURA 1- Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica no Brasil no ano de 2002 (Funasa, 2002).

1.2. *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* é um helminto trematódeo, digenético de sexos separados. Para seu desenvolvimento, o parasito necessita de dois hospedeiros, a primeira fase em um invertebrado, caramujo do gênero *Biomphalaria*, e a segunda fase em um vertebrado. Em sua fase adulta, o *S. mansoni* habita o sistema portal-hepático do hospedeiro vertebrado, principalmente a veia porta e as veias mesentéricas inferiores. A fêmea possui uma estrutura corpórea mais fina e longa, seu comprimento varia entre 1,2 a 1,6 cm, enquanto que o macho é mais curto e robusto, possuindo um canal central denominado ginecóforo, local onde a fêmea se aloja durante a cópula (Figura 2). Para

sua fixação na parede dos vasos, ambos os sexos possuem ventosas oral e ventral (Hinrichsen, 2005).



FIGURA 2- Vermes de *S. mansoni*, observando-se a fêmea filiforme e parcialmente dentro do canal ginecóforo do macho (Kayser, 2005).

1.3. CICLO BIOLÓGICO

Durante seu ciclo evolutivo, as fêmeas adultas migram da luz dos vasos sanguíneos do hospedeiro definitivo para ovipor nas ramificações mais finas das veias mesentéricas. Os ovos que atravessarem a mucosa intestinal e forem evacuados com as fezes, e que chegarem a alguma coleção de água doce, sofrem influência da baixa osmolaridade do meio, de estímulos luminosos e da temperatura, o que leva a intensos movimentos da larva e à ruptura da casca do ovo, liberando larvas ciliadas chamadas miracídios. Os miracídios nadam em círculos durante algumas horas até encontrarem seu hospedeiro intermediário, um caramujo do gênero *Biomphalaria*. Dentro dos caramujos, os miracídios se dividem e, após algumas semanas, liberam na água as cercárias. As cercárias são larvas multicelulares com uma cauda bifurcada. Quando abandonam o caramujo, permanecem nadando, até encontrar o hospedeiro vertebrado. Ao penetrar na pele do hospedeiro, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos,

ganhando a circulação geral e alojando-se no sistema porta intra-hepático (Figura 3) (Rey, 2001).

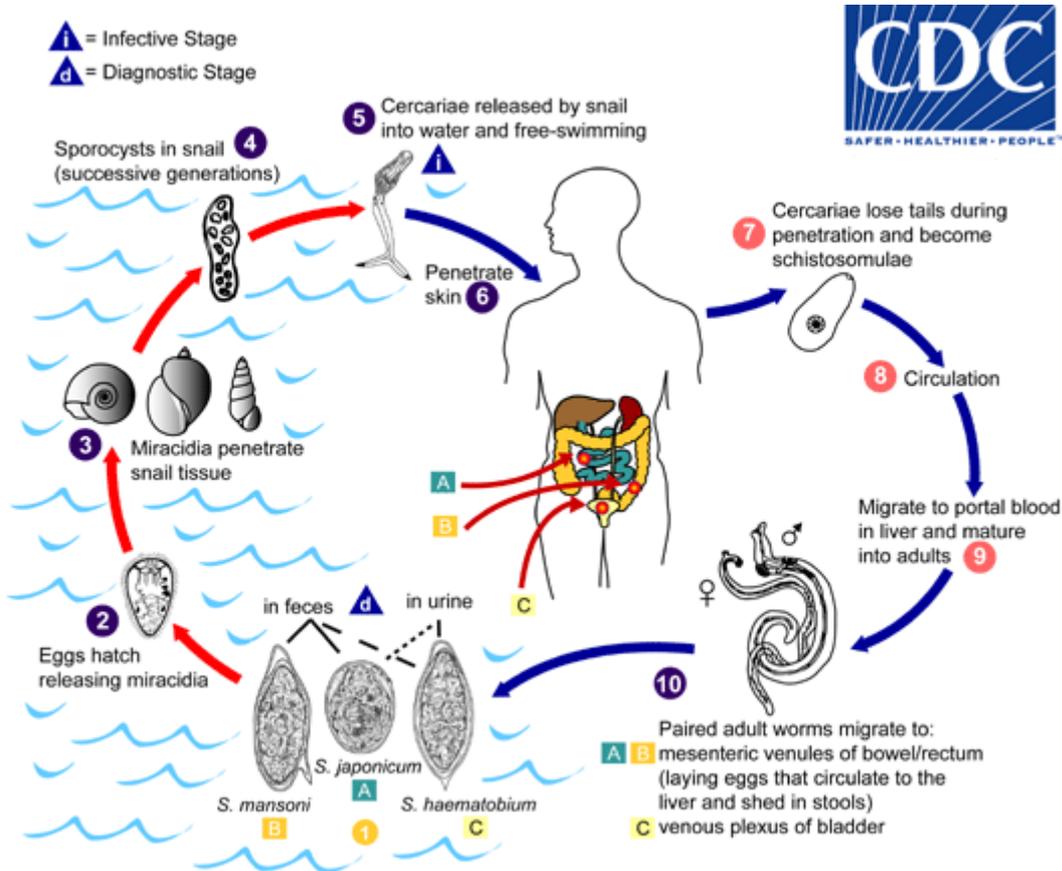


FIGURA 3 – Ciclo de vida do *Schistosoma*. (Centers for Disease Control and Prevention, CDC – site <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>, acessado em 19 de outubro, 2015).

1.4. PATOGENIA

A patogenia da esquistossomose está relacionada a diversos fatores, tais como: cepa ou isolado do parasito, carga parasitária adquirida, idade, estado nutricional e resposta imunológica do indivíduo. Destes, os que parecem ter maior importância são a carga

parasitária e a resposta imunológica. A entrada das cercárias através da pele causa uma reação chamada de dermatite cercariana ou dermatite do nadador, ocorrendo sensação de comichão, erupções urticariformes e dentro de 24 horas aparecem eritema, edema, pequenas pápulas e dor, uma manifestação de hipersensibilidade que ocorre principalmente nas reinfecções (Neves *et al.*, 2010). Após ultrapassar a barreira da derme, os esquistossômulos acessam os vasos sanguíneos (Gray *et al.*, 2011), podendo migrar através de duas vias: uma sanguínea e outra transtissular (Neves *et al.*, 2010).

Durante a fase aguda as formas da doença podem ser inaparentes ou assintomáticas na maior parte dos indivíduos. Quando a infecção se encontra na fase aguda sintomática pode apresentar quadro clínico pouco sintomático, moderado, grave e/ou complicado. A partir da terceira ou quarta semana após a infecção surgem sintomas como: mal estar, febre, hiporexia, tosse seca, sudorese, dores musculares, dor na região do fígado ou intestino, diarreia, cefaleia, prostração, entre outros. Com o início da oviposição aumentam os sintomas, o paciente sente-se abatido, apresentando hepatomegalia e esplenomegalia dolorosas, taquicardia e hipotensão arterial.

As principais manifestações clínicas da infecção são provocadas pelas substâncias secretadas pelos ovos do parasito nos tecidos do hospedeiro, provocando lesões granulomatosas (Guimarães *et al.*, 2008). O fígado e o intestino são os órgãos mais acometidos, onde se desenvolvem granulomas contendo em seu interior os ovos de *S. mansoni* (Bardiale *et al.*, 2006). O ovo de *S. mansoni* não tem como via seguir o fluxo sanguíneo, e sim vencer o fluxo sanguíneo venoso e atravessar a parede do vaso, sendo eliminado junto com o bolo fecal. Esse trajeto pode levar de seis dias até semanas (Woodstock *et al.*, 1971). A formação do granuloma ocorre em vários órgãos e tecidos, caracterizando a forma crônica da doença, ocasionando hipertensão portal, formação de

pseudotumores, disfunções neurológicas e lesões vasculares pulmonares (Souza *et al.*, 2011).

1.5. ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE

Devido ao seu comportamento focal e amplamente diverso, não é uma tarefa fácil definir parâmetros para classificar o grau de endemicidade da esquistossomose mansônica. A endemicidade de uma localidade pode ser estimada de acordo com a prevalência da área. Áreas de baixa endemicidade possuem prevalência inferior a 5 %; áreas de média endemicidade, prevalência superior a 5 %; áreas de alta endemicidade possuem prevalência superior a 15% (Ministério da Saúde, 2005). Em locais de baixa prevalência a distribuição geográfica dos portadores da infecção é maior e os indivíduos com morbidade severa são bem localizados. Porém, essa característica também pode ser vista em locais de alta endemicidade nos quais medidas de controle foram empregadas. A intensidade da infecção, definida pela quantidade de ovos por grama de fezes, também deve ser levada em consideração quando se pretende classificar a endemicidade de um local (Ministério da Saúde, 2005; WHO, 1993).

As áreas de transmissão, considerando histórico de transmissão e extensão geográfica, podem também ser classificadas como: área endêmica, caracterizada por um conjunto de localidades contínuas em que a transmissão está estabelecida; área de foco, área endêmica circunscrita dentro de uma área até então indene, geralmente, como consequência de mudanças ambientais ou socioeconômicas que tornaram o estabelecimento da doença possível; área indene, não há registro de infecção de esquistossomose; área vulnerável, originalmente área indene, com a presença de

hospedeiro intermediário onde modificações ambientais produzidas natural ou artificialmente possibilitam a consolidação de indivíduos infectados (Ministério da Saúde, 2014).

A eliminação da esquistossomose como um problema de saúde pública e a interrupção da transmissão em algumas áreas são objetivos operacionais da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013). A base do controle da infecção é a quimioterapia preventiva, que é administração de praziquantel em larga escala para grupos de risco. Entretanto, para atingir a eliminação da transmissão, medidas de controle adicionais são recomendadas. Entre essas medidas estão: aumento da frequência da quimioterapia preventiva, melhoria do acesso à água potável, saneamento adequado e o controle dos hospedeiros intermediários (Grimes *et al.*, 2014; Rollinson *et al.*, 2013).

Em alguns países a esquistossomose já foi considerada eliminada, como, por exemplo, a Tunísia e o Marrocos, embora ainda não existam critérios definidos para certificar a interrupção da doença. Outros países estão em vias de eliminação, o que leva ao atual interesse em definir as estratégias para seguir rumo à interrupção da transmissão e sua certificação (WHO, 2009).

O diagnóstico para esquistossomose normalmente é realizado através de exame de fezes, porém, em locais com baixa intensidade de infecção (menos de 100 ovos por grama de fezes), o diagnóstico por este meio torna-se pouco eficaz. Nesse contexto, ensaios que detectam anticorpos também apresentam algumas limitações como: resultados afetados por tratamentos anteriores, reatividade cruzada com outros parasitos, e particularmente pela persistência de anticorpos após a eliminação da infecção (WHO, 2009).

Novas estratégias de imunodiagnóstico estão sendo testadas para infecções com baixa carga parasitária, como por exemplo, a utilização do antígeno microssomal do *Schistosoma mansoni*, o MAMA, tanto em imunotransferência (*Western Blot*, WB) quanto em ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Métodos que detectam antígenos circulantes na urina e no soro, como antígeno circulante catódico (CCA), que já está sendo testado em estudos epidemiológicos, e antígeno circulante anódico (CAA), e a detecção de DNA em amostras de fezes, que estão sendo desenvolvidos e padronizados (WHO, 2009).

1.6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

1.6.1. MÉTODOS DIRETOS

Os métodos diretos caracterizam-se pela visualização dos ovos ou através da demonstração da presença do parasito em tecidos, ou de seus antígenos em exames de laboratório.

Os métodos parasitológicos consistem na detecção dos ovos do parasito nas fezes ou de qualquer forma parasitária em biópsias. Devido à morfologia única do ovo, onde se encontra o espículo lateral, o diagnóstico parasitológico apresenta uma alta especificidade, embora dependa da ampla experiência do observador e da adesão a protocolos rigorosos de leitura das lâminas ao microscópio óptico. A maior desvantagem destes métodos, porém, é a baixa sensibilidade em casos como: período pré-patente, que dura em média de 4 a 6 semanas e não há oviposição, infecções unissexuais; ausência de eliminação dos ovos após medicação e infecções leves ou casos antigos de contaminação, onde ocorre falta ou inconstância da eliminação de ovos

(Rey, 2001). A distribuição heterogênea dos ovos nas fezes dos pacientes infectados também contribui para a não visualização dos ovos nas amostras fecais contaminadas (Utzinger *et al.*, 2001).

A técnica mais utilizada atualmente em serviços de saúde é o método de Kato-Katz (KK) (Katz *et al.*, 1972; Katz, 2008). O KK utiliza uma pequena quantidade de fezes, 0,042 g, e utiliza para clarificação das fezes uma mistura de água e glicerina contra-corada com verde de malaquita (Katz *et al.*, 1972). Este método é recomendado pela OMS para estudos epidemiológicos de esquistossomose intestinal, por ser de simples execução e relativamente barato (Gray *et al.*, 2011).

O método de sedimentação espontânea, também conhecido como método de Hoffman, Pons e Janer (1934) ou somente método de Lutz, consiste em isolar ovos de helmintos concentrados na sedimentação espontânea do material fecal diluído em água (Hoffman *et al.*, 1934).

O diagnóstico pelo método de Bell (1963) baseia-se na filtração de uma amostra de fezes utilizando-se malhas com poros variando entre 500 e 350 μm . Ao final, os ovos ficam retidos em papel filtro e são corados pela ninidrina. Esse corante possui uma grande afinidade a aminoácidos, deixando os miracídios de cor púrpura, adquirindo um contraste marcante entre os detritos escuros da amostra. A visualização é realizada em microscópio óptico (Bell, 1963).

Já o método de eclosão de miracídios é fundamentado no comportamento fototrópico dos miracídios (Williams & Coelho, 1975). A amostra fecal é lavada e colocada em um tubo com água filtrada, por alguns minutos ou horas, para que ocorra a

eclosão dos miracídios e estes possam ser visualizados a olho nu ou em lentes simples (Zicker *et al.*, 1977).

O método de gradiente salino é baseado na sedimentação diferencial dos ovos quando estes são submetidos a um fluxo lento e contínuo de solução salina 3% por meio de uma placa porosa. Segundo Coelho *et al.* (2008), a sensibilidade do método gradiente salino é maior do que o método de Kato-Katz, porém esta técnica ainda precisa ser validada em grandes populações.

Na busca de métodos mais sensíveis, o Helmintex foi desenvolvido pelo laboratório de biologia parasitária da PUCRS (Teixeira *et al.*, 2007), proporcionando um avanço significativo na detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes. Esse método constitui no processamento de 30 g de amostra fecal, submetidos a uma sequência de passos de concentração, que findam no isolamento dos ovos pela interação com esferas paramagnéticas em um campo magnético. Em seguida, a análise microscópica é feita utilizando todo o sedimento, que varia normalmente entre 0,5 e 1,0 mL. A sensibilidade do Helmintex é de 100%, até 1,34 ovos/grama de fezes, estimada em experimentos de semeadura realizados no laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS (Teixeira *et al.*, 2007). Em estudo de campo realizado em Bandeirantes, no Paraná, foi feita a comparação entre o Helmintex e o KK, e o Helmintex apresentou maior sensibilidade que o KK (Caldeira *et al.*, 2012). Quando foi comparado ao método do gradiente salino, em estudo realizado em Maranguape, no estado do Ceará, o Helmintex demonstrou ser mais eficaz na detecção de infectados. Este trabalho também comparou o Helmintex com o método de KK, sendo novamente o Helmintex teve melhor recuperação de ovos e maiores estimativas de prevalência (Pinheiro, 2010). Os mecanismos que envolvem a mobilização dos ovos de *S. mansoni* com microesferas quando submetidos a um campo

magnético no Helmintex ainda estão sob investigação, porém estudos prévios sugerem que a interação entre os ovos e as microesferas paramagnéticas não possui origem magnética, estando mais relacionada com as diferenças de cargas eletrostáticas na superfície dos ovos e das microesferas (Karl *et al.*, 2013; Candido *et al.*, 2014).

A pesquisa de antígeno circulante do parasito, pelo método de ELISA de captura, embora seja um teste imunológico, é considerado por muitos como um método de diagnóstico direto, pois demonstra a presença do antígeno circulante secretado pelo verme adulto (Ministério da Saúde, 2014). Essa técnica utiliza anticorpo monoclonal e possui como vantagem a detecção da infecção aguda, pois o antígeno desaparece logo após o tratamento, e, além disso, possui uma alta especificidade (Van Dam *et al.*, 2004). A desvantagem desse método é ser “muito trabalhoso”, possuir baixa sensibilidade para casos com pequenas cargas parasitárias e alto custo (Ministério da Saúde, 2014).

Um teste rápido para urina, “*point of care*” (POC) que detecta antígeno circulante catódico (CCA) do verme adulto vem sendo testado há alguns anos. Esse método tem demonstrado algumas vantagens, como: utilização da urina, amostra menos invasiva e mais fácil de ser obtida; facilidade de uso em campo, simples execução e alta sensibilidade (Adriko *et al.*, 2014; Colley *et al.*, 2013; Coulibaly *et al.*, 2011). O desempenho do POC-CCA vem sendo testado em alguns países, e deve ser avaliado continuamente para a detecção de possíveis falhas e limitações, para posterior utilização em programas de controle da esquistossomose.

A detecção de ácidos nucleicos como recurso diagnóstico, especialmente através da amplificação de sequências de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem sido ensaiada para o diagnóstico da esquistossomose. A primeira aplicação da PCR para

diagnóstico de *S. mansoni* foi realizada em amostras de fezes (Pontes *et al.*, 2002; Pontes *et al.*, 2003), em uma área endêmica, com amplificação de 121 pares de bases (Hamburguer *et al.*, 1991). O resultado desse estudo demonstrou que, em comparação ao método tradicional de Kato-Katz, a PCR obteve uma sensibilidade de 96,7% e especificidade de 88%, e não demonstrou reação cruzada com outros helmintos. Devido a sua alta sensibilidade, os autores do estudo sugerem que o método da PCR pode ser aplicado também em áreas de baixa transmissão (Pontes *et al.*, 2003).

Com o avanço da tecnologia, a reação que até então proporcionava a detecção do DNA alvo ao final da reação, também pode detectar no instante em que a reação está ocorrendo, através da PCR em tempo real. Este método tem se tornado uma ótima alternativa no que se refere ao diagnóstico, através da combinação de excelente sensibilidade (95%), especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de uso e rapidez (Lier *et al.*, 2006). Porém, de acordo com Teixeira (2011) métodos baseados na PCR, apresentam desvantagens, tais como: impossibilidade de calcular o número de ovos por gramas de fezes, baixa reprodutibilidade e presença de inibidores na amostra, alertando para a necessidade da utilização inicial de um método de concentração de ovos.

Outros métodos diretos incluem: biópsia retal, biópsia hepática, e biópsia de outros órgãos como pulmão, medula espinhal, pele, testículos, ovários e cérebro. Nestes órgãos a biópsia para identificação dos vermes representa a única forma de concluir o diagnóstico (Ministério da Saúde, 2014).

1.6.2. MÉTODOS INDIRETOS

Os métodos indiretos baseiam-se em reações imunológicas antígeno-anticorpo e são aplicados quase sempre em inquéritos epidemiológicos, com o auxílio ou não de exame de fezes. Esses métodos são pouco utilizados em serviços de rotina por serem de complexa execução, de alto custo e por exigirem equipamentos sofisticados.

O teste de ELISA é o método de diagnóstico sorológico mais utilizado para a infecção por *S. mansoni*, pois permite detectar classes distintas de anticorpos, assim como a utilização de diversos antígenos. Inicialmente utilizavam-se, antígenos solúveis do ovo (SEA) e proteínas solúveis de vermes adultos (SWAP), porém a baixa sensibilidade desses antígenos levou a uma busca de novos antígenos purificados, como: fração catiônica 6 (CEF6) (Doenhoff *et al.*, 1993), antígenos microssomal do *S. mansoni* (MAMA) (Tsang *et al.*, 1983) e o antígeno de 31/32 kDa (Ruppel *et al.*, 1990).

Estudos que utilizam o *Western-blot* (WB) como metodologia para o diagnóstico de esquistossomose demonstram que esse teste é uma alternativa para detectar a diferença entre a fase aguda e a fase crônica da doença (Valli *et al.*, 1999). Além disso, um kit de WB com tiras do antígeno bruto do parasito (Sulahian *et al.*, 2005) e a detecção por ensaios de imunoblot de componentes de membrana de vermes adultos do *S. mansoni* (Cesari *et al.*, 2005), vem sendo desenvolvidos e avaliados e ambos parecem apresentar alta sensibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Atualizar e explorar indicadores da interrupção da transmissão de esquistossomose no município de Esteio, Rio Grande do Sul.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Revisar e atualizar dados dos 28 indivíduos infectados por *Schistosoma mansoni* em Esteio, entre 1997 e 2011.
- Verificar a existência de indivíduos infectados, em parte Grupo de Risco e na população de estudantes da Escola Trindade, Vila Pedreira, Esteio; através do teste rápido para urina “*point of care*” para detecção de antígeno circulante catódico (POC-CCA) e do ensaio de imunoeletrótransferência (Western-Blot) utilizando antígeno microssomal do *Schistosoma mansoni* (MAMA).
- Comparar os resultados obtidos com POC-CCA e WB-MAMA com a pesquisa de ovos pelo método Helmintex.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Locais de desenvolvimento do trabalho:

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas e no Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências da PUCRS. Foram realizados também parte dos procedimentos de coleta na Escola Trindade, Vila Pedreira, com participação da unidade básica de saúde e equipe de agentes comunitárias.

3.2. Áreas e grupos populacionais de estudo:

A área do Valo da Três Portos (VTP, ou área do “Seu Remi”, ou área da “Via Férrea”), que continuou com transmissão ativa documentada até 2011, Novo Esteio e Vila Pedreira (Figura 4).

Ao longo de 18 anos de acompanhamento das áreas em Esteio, foi definido um “Grupo de Risco” que hoje inclui 62 pessoas, definido por “qualquer histórico de contato com águas” nos focos de Esteio, com transmissão confirmada: Banhado do Azeite (BA) e Valo da Três Portos (VTP); ou com suspeita de transmissão como a Fazenda ou Agropecuária Kroeff. Neste Grupo de Risco, está o grupo de ex-infectados, que foi objeto de revisão e atualização de dados.

Na Vila Pedreira, a população de estudo foram crianças em idade escolar, de 6 a 9 anos, da Escola de Ensino Infantil Trindade. A escolha dessa faixa etária é devido ao último estudo epidemiológico ter sido realizado há 14 anos, pois a presença de crianças positivas é um indicador de transmissão recente. Além disso, a escolha de crianças em

idade escolar para esse tipo de estudo é adequada como referência da prevalência da população geral (Pereira *et al.*, 2010).

3.3. Revisita aos 28 indivíduos com histórico de infecção por *Schistosoma mansoni*:

Um total de 28 pessoas, de diversas faixas etárias, que tiveram a infecção por *S. mansoni* confirmada, entre o período de 1997 a 2011, foram investigadas. Coletas de sangue foram realizadas para análise sorológica.

Também foi realizado um levantamento nos arquivos do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS de todos os exames realizados nesses pacientes ao longo do tempo, até o ano de 2015.

3.4. Atividade de educação em saúde na Escola Trindade de Vila Pereira em Esteio:

Na escola de Vila Pedreira as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com as faixas etárias. Na primeira parte da atividade foi apresentado o vídeo “O xis na xistose” (disponível no site xistose.com, do grupo liderado pelo Dr. Cristiano Lara Massara, FIOCRUZ Minas Gerais), um desenho animado contando a história de um menino que se infectava com esquistossomose. Após a exibição do vídeo, estimulamos as crianças a falar sobre o que tinham entendido. Foram feitos questionamentos sobre como a doença era adquirida e sobre como acontecia a contaminação ambiental. Também foi montado o ciclo do parasito com a ajuda das crianças. Neste momento foram mostradas conchas de *Biomphalaria*, caramujos em aquários, vermes e ovos de *S. mansoni*. Após este exercício foi explicada qual é a atividade de pesquisa que o grupo

da PUCRS está desenvolvendo atualmente na comunidade. E, por fim, foi solicitado às crianças que elaborassem um desenho sobre tudo que havíamos conversado.

3.5. Análise sorológica:

A análise sorológica foi feita nos indivíduos do Grupo de Risco formado por indivíduos que apresentaram comportamento de risco, definido como “contato com valos e banhados na região de novo esteio”, especialmente no sub-grupo de indivíduos ex-infectados. Também foi realizado o inquérito sorológico nas crianças da escola de Vila Pedreira. A sorologia foi feita pelo método de imunoeletrortransferência (*Western-blot*) com antígeno microssomal do *Schistosoma mansoni* (MAMA). O sangue dos indivíduos em estudo foi coletado utilizando-se seringas de 5 mL (BD Plastipak) e acondicionados em falcons de 15 mL (Techno Plastic) para posterior separação do soro. Os soros foram estocados e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso. A diluição do anticorpo primário foi feita 1:100 em PBS 1X + tween 0,3% + leite em pó 5%, as amostras foram incubadas por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1X + tween 0,3% por 5 minutos. A diluição do anticorpo secundário (anti-human IgG peroxidase) foi 1:2000 em PBS 1X + tween 0,3% + leite 5%. A revelação foi feita com DAB (3,3'-Diaminobenzidina). Foi aplicado sobre as tiras a serem reveladas 60 mL de PBS 1X + tween 0,3% + 150 μL de H_2O_2 + 1 pastilha de DAB (10mg/pastilha), ficando sob agitação por aproximadamente 4 minutos. As membranas com o antígeno MAMA imobilizado foram adquiridas através de colaboração com o Dr. Sukwan Handali do CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*, Atlanta, EUA).

3.6. Análise da urina:

A análise da urina das crianças da escola da Vila pedreira foi realizada utilizando o teste rápido “*point of care*” do antígeno circulante catódico (POC-CCA), disponível comercialmente (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, uma gota de urina foi adicionada ao poço do cassete do teste e deixada para absorção. Uma vez que foi absorvida, uma gota de tampão (incluso no kit) foi adicionada no mesmo poço, e o cassete ficou em repouso por 20 minutos para posterior leitura dos resultados. A interpretação dos resultados foi realizada por 3 leitores distintos simultaneamente no tempo de 20 minutos após a adição do tampão. Os leitores foram previamente treinados. Os testes foram considerados inválidos quando não aparecia banda de controle interno. Os resultados foram considerados positivos quando a intensidade da banda teste era igual à banda controle ou quando era possível visualizar a banda, mesmo que pouco intensa. Os resultados foram considerados “traço” quando a banda teste não apresentou limites nítidos e contínuos. E, finalmente, foram considerados resultados negativos quando não observou-se banda na posição teste.

3.7. Confirmação de possíveis casos positivos pelo método Helmintex:

Os indivíduos que tiveram resultados positivos para os testes sorológico e imunocromatográfico foram solicitadas amostras de fezes para a realização do método Helmintex. O método foi realizado conforme Teixeira *et al.*, 2007: aproximadamente 30 g de fezes foram diluídas em uma solução contendo 10 mL de etanol 70% e 10 mL de Tween20 (USB corporation) a 1%, filtradas, e deixadas para sedimentação espontânea

por cerca de uma hora. A tamisação foi realizada com a passagem das fezes através de telas metálicas com poros de 100 µm e 325 µm, respectivamente, sendo que a última retém os ovos. O sedimento contendo os ovos foi submetido a gradiente com acetato de etila e então, incubado com 19 µl de uma suspensão contendo 53 mg/mL de esferas paramagnéticas em um campo magnético por 30 minutos. O material resultante foi estocado em microtubo de 1,5 mL (Eppendorf, USA) para posterior exame ao microscópio óptico. O sedimento resultante do Helmintex foi lido até seu esgotamento em lâminas de vidro, ao microscópio óptico, utilizando-se aumento de 100x. Cada amostra examinada teve seu registro com o nome do indivíduo e o resultado observado.

3.8. Considerações éticas:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, conforme o número: CAAE 18944614.3.0000.5336. O consentimento era necessário para participação no estudo e a privacidade dos participantes foi garantida. Foi obtido o termo de consentimento dos indivíduos maiores de 18 anos, e dos responsáveis na ocorrência de menores de idade.

4. RESULTADOS

4.1. Atualização dos dados dos 28 indivíduos infectados por *S. mansoni*:

Os 28 indivíduos com histórico de infecção por esquistossomose residiam em três principais localidades: Vila Pedreira, Novo Esteio e Valo da Três Portos. Fomos ao procura deles nesses locais, e, além disso, também foram feitas visitas aos antigos focos de transmissão (Figuras 4, 5, 6 e 7). O Banhado do Azeite, foco confirmado de esquistossomose, foi drenado e aparentemente deixou de ser foco de transmissão. O Valo da Três Portos também se encontrava seco, já com mudanças ambientais provocadas por problemas sociais locais e pela construção da BR-448 (Figuras 8 e 9). Porém, com a ocorrência de chuvas, ainda há constantes alagamentos. A Fazenda Kroeff devido à construção da BR-448, também apresenta modificações do ambiente e restrições para a circulação de pessoas (Figura 11).

A atualização dos dados dos indivíduos com histórico de infecção por *S. mansoni* foi feita através do levantamento de todas as informações contidas nos arquivos do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS (Tabela I). Inicialmente, Vila Pedreira e Novo Esteio eram os locais de origem de grande parte dos indivíduos infectados, porém, a partir de 2007, os casos registrados de esquistossomose eram majoritariamente vindos do Valo da Três Portos (Tabela II). Foram realizadas buscas aos ex-infectados nesses locais, para que pudessem ser feitos os exames de controle. Porém, muitos indivíduos já não residiam no mesmo local. Alguns deixaram Esteio, afastando-se assim do foco, outros poucos permaneceram no mesmo local ainda próximo as áreas de transmissão (Tabela III).

Ao longo dos anos, os 28 indivíduos foram diagnosticados e acompanhados de forma não sistemática e com diferentes procedimentos, atendendo diversas recomendações e sugestões. Nos primeiros anos foram realizados somente exames de fezes (método de Kato-Katz, depois acrescido de sedimentação espontânea, até o desenvolvimento do Helmintex). Foram também realizados inquéritos sorológicos: imunofluorescência indireta (RIFI) em 1999; ensaio imunoenzimático (ELISA) IgA e IgG em 2001; e WB-MAMA a partir de 2008. Algumas amostras de soro coletadas antes de 2008 também foram testadas pelo WB-MAMA, quando este método se tornou disponível (Figura 13).

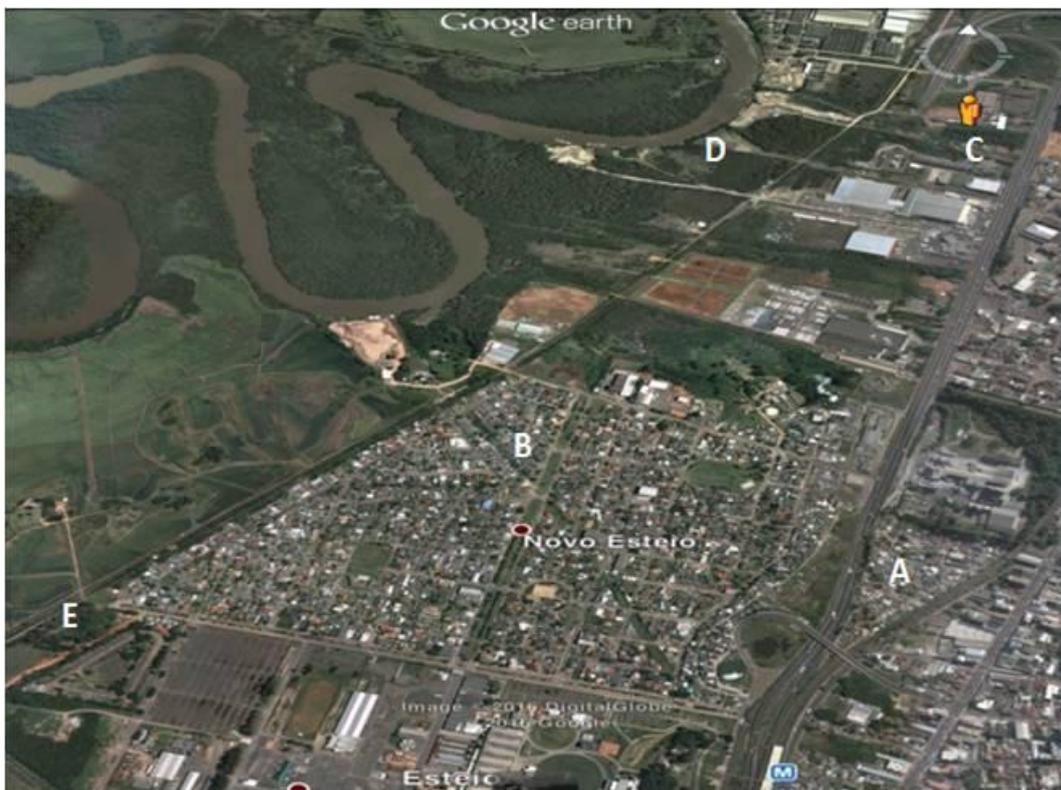


FIGURA 4: Vista aérea dos locais de residência dos 28 indivíduos com histórico de esquistossomose. A: Vila Pedreira; B: Novo Esteio; C: Valo da Três Portos. Áreas de transmissão de esquistossomose. D: Banhado do Azeite; E: Fazenda Kroeff. Observa-se à esquerda o Rio dos Sinos e à direita a BR-116.



FIGURA 5: Vista aérea das localidades de residência de indivíduos infectados, Vila Pedreira: 01, 02, 07, 08, 13, 14, 17. A: BR-116; B: Linha Férrea; C: Fábrica Votorantim; D: Escola Trindade.



FIGURA 6: Vista aérea das localidades de residência de indivíduos infectados, Novo Esteio: 03, 04, 05, 11, 12, 15, 16, 18, 22, 25. A: BR-116; B: Parque de Exposições; C: Fazenda Kroeff.



FIGURA 7: Vista aérea das localidades de residência de indivíduos infectados, Valo da Três Portos (VTP): 06, 09, 10, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28. A: BR-116; B: BR-448.



FIGURA 8: Vista do fundo da área VTP, junto à via férrea. Local onde os banhados foram todos modificados pela construção da BR-448.



FIGURA 9: Vista da frente da área do VTP, junto a BR-116. À direita observa-se muro que delimita área em construção. Terraplenagem no restante do terreno da frente exemplifica as mudanças que eliminaram o Valo que deu nome à área.



FIGURA 10: Área Casa dos Trilhos. Local que teve demonstração de caramujos infectados e que também sofreu mudanças ambientais devido à construção da BR-448.



FIGURA 11: Canal principal da Fazenda Kroeff. Local onde foram encontrados exemplares de *Biomphalaria glabrata*. A fazenda encontra-se no fundo do Parque de Exposições, onde os indivíduos da Vila Pedreira e de Novo Esteio aproveitavam para se banhar. Esta fotografia de 2014 que mostra os sinais de abandono do canal, pela obra da BR-448 e pela mudança de regime de exploração agrícola para exploração imobiliário.



FIGURA 12: Vista da BR-448. Também chamada Rodovia do Parque, cruza a via férrea Ramal da Siderúrgica Rio-Grandense em um viaduto que se encontra exatamente na parte de banhados dos fundos da área do VTP.

Tabela I - Resumo de dados e evolução dos indivíduos com esquistossomose detectados entre janeiro 1997 e dezembro de 2015, em Esteio, Rio Grande do Sul.

Identificação	Data Diagnóstico	Local de moradia	Evolução	2015
01	Janeiro 1997 Internou com “hepatite” no Hospital em Sapucaia, quando fez exame de fezes.	Vila Pedreira	Tratado com Oxamniquine. Estava positivo no inquérito da Vila Pedreira (outubro de 1997) e foi re- tratado com Praziquantel. Exames de controle negativos (Maio e Outubro de 2000). Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro 2004.	Apresentou sorologia positiva. Recusou ceder amostra de fezes para análise por Helmintex.
02	Outubro 1997 Inquérito Vila Pedreira.	Vila Pedreira	Tratado com Praziquantel em novembro de 1997. Estava positivo nos exames de Outubro de 2000. Re- tratado com Oxamniquine em dezembro de 2000. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro 2004.	Apresentou sorologia negativa.
03	Outubro 1998 Apresentou urticária, e a unidade básica de saúde encaminhou para exame.	Novo Esteio	Tratado com Oxamniquine em novembro de 1998. Estava negativo nos exames de controle em janeiro 1999. Morando em São Francisco de Paula em outubro de 2004.	Não foi encontrado. Familiares relataram que ele está morando em Santa Catarina.
04	Outubro 1998	Novo Esteio	Tratado com Oxamniquine	Não foi

	Acompanhava o caso 3 ao Banhado do Azeite (BA).		em novembro de 1998. Encontrado. Estava negativo nos exames de controle de cura em janeiro de 1999. Não encontrado em 2004 (foragido).	
05	Outubro 1998 Irmão do caso 3, o acompanhava ao BA.	Novo Esteio	Tratado com Oxamniquine em novembro de 1998. Estava negativo nos exames de controle em janeiro de 1999. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro 2004.	Não foi encontrado. Familiares relataram que ele está morando em Santa Catarina.
06	Outubro 1998 Assintomático. Inquérito Fundos da Lansul.	Valo da Três Portos (VTP)	Tratado com Oxamniquine em novembro de 1999. Estava negativo nos exames de controle em Maio e outubro de 2000. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004.	Não foi encontrado.
07	Maio 2000 Assintomático. Inquérito Grupo de Risco (GR).	Vila Pedreira	Tratado com Oxamniquine em outubro de 2000. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004.	Apresentou sorologia positiva. Não cedeu amostra de fezes para análise por Helmintex.
08	Maio 2000 Assintomático. Inquérito GR.	Vila Pedreira	Tratado com Oxamniquine em dezembro de 2000. Exame de controle (Helmintex e eclosão de	Viajando a trabalho.

			miracídios) negativo em outubro de 2004.	
09	Julho 2000 Apresentou dor abdominal, médico encaminhou para exame em laboratório particular.	VTP	Tratado com Praziquantel pelo seu médico, em Julho 2000. Exames de Outubro de 2000: presença de apenas um ovo infértil em três amostras de fezes. Mudou-se (não encontrado em outubro 2004).	Não foi encontrado.
10	Outubro 2000 Inquérito GR.	VTP	Tratado com Oxamniquine em dezembro de 2000. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004. Positivo em 1 de 3 amostras em 15 de julho de 2010. Tratado nesta data novamente.	Apresentou sorologia negativa.
11	Outubro 2000 Inquérito GR.	Novo Esteio (Agropecuária a Kroeff)	Tratado com Oxamniquine em dezembro de 2000. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004.	Não foi encontrado.
12	Outubro 2002 Pesquisa diagnóstico sorológico.	Novo Esteio	Tratado com Oxamniquine em outubro de 2002. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004.	Morando em Montenegro, RS.
13	Outubro 2002 Pesquisa diagnóstico sorológico.	Vila Pedreira	Tratado com Oxamniquine em novembro de 2002. Exame de controle (Helmintex e eclosão de	Falecido de outra causa.

			miracídios) negativo em outubro de 2004.	
14	Janeiro 2003 Pesquisa diagnóstico sorológico.	Vila Pedreira	Tratado com Oxamniquine em janeiro de 2003. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004.	Morando em Canoas, RS.
15	Junho 2003 Pesquisa diagnóstico sorológico.	Novo Esteio	Tratado com Oxamniquine em junho de 2003. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro 2004.	Morando em Imbé, RS.
16	Julho 2003 Pesquisa diagnóstico sorológico.	Novo Esteio	Tratado com Oxamniquine em julho de 2003. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro de 2004.	Apresentou sorologia negativa.
17	Julho 2003 Pesquisa diagnóstico sorológico.	Vila Pedreira	Tratado com Oxamniquine em agosto de 2003. Exame de controle (Helmintex e eclosão de miracídios) negativo em outubro 2004.	Apresentou sorologia positiva. Não cedeu amostra de fezes para análise por Helmintex.
18	Junho 2001 (Exame analisado em 2006)	Novo Esteio	Amostra positiva confirmada pelo método Helmintex em 2006.	Não foi encontrado.
19	Julho 2007 Familiar de W.L.J., frequentava o	VTP	Amostra de fezes positiva por Helmintex em 2007.	Não foi encontrado.

	VTP.				
20	Julho 2007 Familiar de W.L.J., frequentava o VTP.	VTP	Apresentou positivo, sem tratamento seguimento posterior.	Helmintex registro de ou de	Não foi encontrado.
21	Novembro 2007	VTP	Apresentou positivo em novembro 2007. Em 2010 apresentou sorologia positiva e Helmintex positivo, possivelmente reinfecção. Em 2010 apresentou sorologia positiva.	Helmintex	Não foi encontrado.
22	Outubro 2008	Novo Esteio	Apresentou positivo, sem registro de tratamento ou de seguimento posterior.	Helmintex registro de ou de	Não foi encontrado.
23	Junho 2009 Possivelmente morador transitório no VTP.	Possivelment e VTP	Helmintex positivo, sem registro de tratamento ou de seguimento posterior.		Não foi encontrado.
24	Junho 2009 Possivelmente morador transitório no VTP.	Possivelment e VTP	Helmintex positivo, sem registro de tratamento ou de seguimento posterior.		Não foi encontrado.
25	Julho 2010 Assintomático. Acompanhava o caso 18 (irmão) ao BA.	Novo Esteio	Tratado com Praziquantel em julho de 2010.		Não foi encontrado.
26	Agosto 2010 Familiar de	Canoas	Amostra positiva pelo método Helmintex em		Apresentou sorologia

	W.L.J., frequentava o VTP.		2010. Tratado Praziquantel.	com	negativa.
27	Junho 2010 Familiar de W.L.J., frequentava o VTP.	Canoas	Amostra positiva método Helmintex 2010. Tratado Praziquantel.	pelo em com	Apresentou sorologia positiva. Amostra de Helmintex negativa.
28	Novembro 2010 Conhecido da família de W.L.J., frequentava o VTP.	Residência original desconhecida .	Apresentou positivo em novembro 2010. Não há registro tratamento ou de seguimento posterior.	Helmintex de	Não foi encontrado.

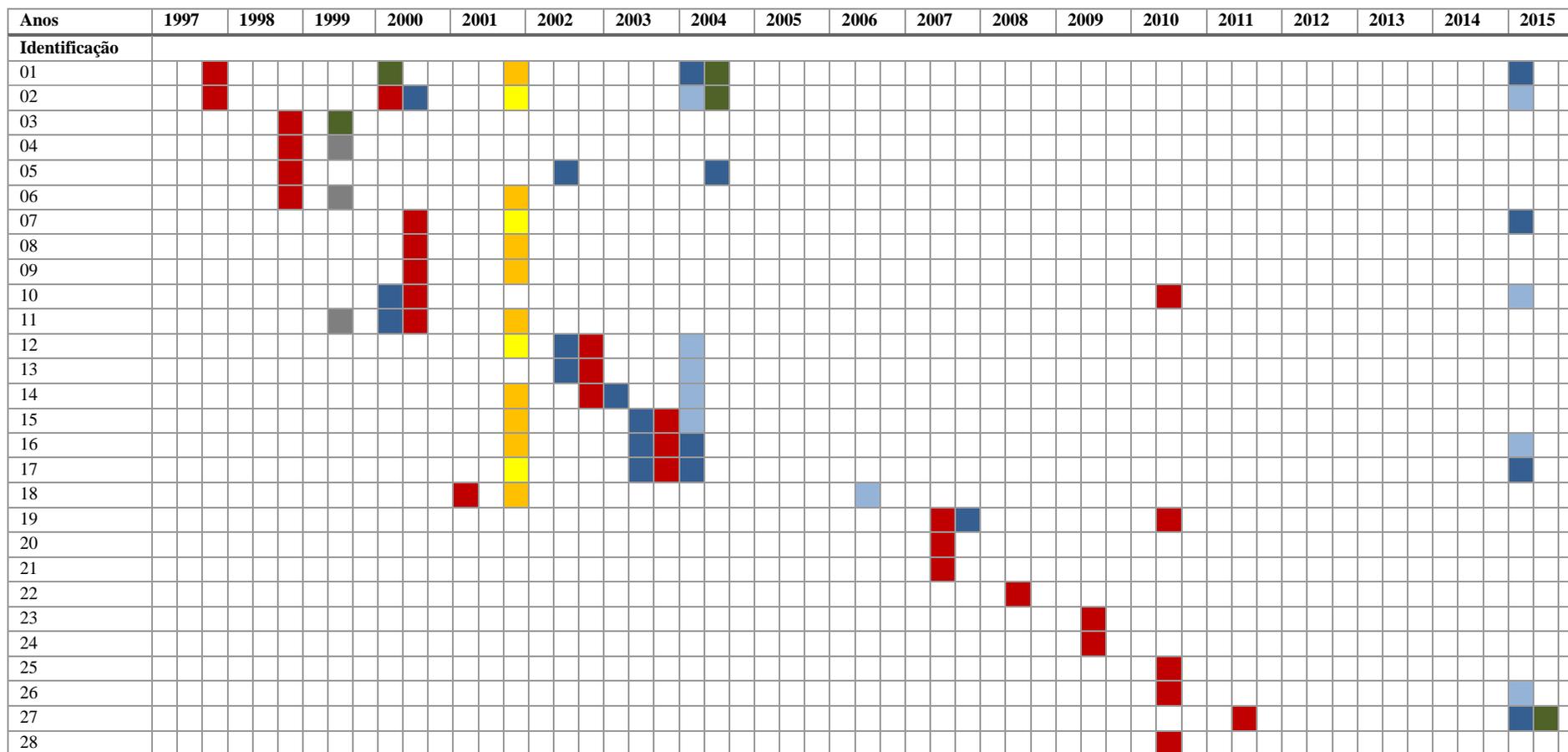
Tabela II: Distribuição dos 28 indivíduos ex-infectados (pontos) quanto à localização original de residência.

Anos	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Local																			
Vila Pedreira	••			••		•	••												
Novo Esteio		•••		•	•	•	••					•		•					
Valo da Trés Portos		•		••							•••		••	••	•				

Tabela III: Distribuição dos 28 indivíduos ex-infectados quanto à localização atualizada de local de residência.

Localização	Indivíduos
Conhecida	18
Mesmo local	5
Local diferente fora de Esteio	12
Local diferente dentro de Esteio	1
Desconhecida	10
Total	28

FIGURA 13 - Descrição dos resultados de exames realizados indivíduos diagnosticados com esquistossomose entre janeiro de 1997 e dezembro de 2015, em Esteio, Rio Grande do Sul.



Legendas: ■ Fezes positivas ■ Fezes negativas ■ ELISA IgA e IgG positivo ■ ELISA IgG positivo ■ RIFI positivo ■ WB-MAMA positivo ■ WB-MAMA negativo

4.2. Atividade de educação em saúde na escola Trindade de Vila Pedreira, Esteio:

Após a exibição do vídeo “o xis da xistose”, as crianças foram questionadas a respeito do que elas haviam compreendido em relação ao vídeo. Algumas disseram “não pode nadar no lago contaminado”, outras lembraram “não pode fazer cocô no lago”. Explicamos e esclarecemos que o principal motivo da água estar contaminada seria o fato de um indivíduo infectado defecar as margens do lago. Enquanto conversávamos, mostramos a elas conchas de *Biomphalaria*, vermes e ovos (Figuras 14 e 15). Também montamos o ciclo da infecção com a participação das crianças. Ao final da atividade foi solicitado que as crianças desenhassem o que haviam aprendido (Figura 16). Nos desenhos havia sempre caramujos, lagos, e algumas desenharam miracídios e cercárias. Em um desenho havia dois meninos conversando e um alertando o outro a não entrar na água contaminada (Figura 17).



FIGURA 14 – Demonstração dos caramujos aos alunos da escola Trindade, Vila Pedreira, Esteio.



FIGURA 15 – Demonstração de vermes e ovos aos alunos da escola Trindade, Vila Pedreira, Esteio.



FIGURA 16 – Alunos desenhando o que haviam aprendido durante a atividade.



FIGURA 17 – Desenhos dos alunos da escola Trindade após a atividade de educação em saúde.

4.3. Análise da urina dos alunos da escola Trindade pelo método rápido “*point of care*” com antígeno circulante catódico (POC-CCA):

A interpretação dos resultados obtidos do POC-CCA pelos três leitores foi diferente em treze casos. A maior discordância foi entre positivo/traço e negativo/traço. Não houve nenhum caso em que se opuseram resultados positivos e negativos (Tabela IV).

Tabela IV – Resultados obtidos nas leituras do POC-CCA pelos diferentes examinadores.

Nº Identificação	Leitor 1	Leitor 2	Leitor 3
03	Positivo	Positivo	Positivo
15	Negativo	Negativo	Negativo
65	Positivo	Positivo	Positivo
50	Negativo	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo	Negativo
57	Positivo	Positivo	Positivo
23	Positivo	Positivo	Positivo
75	Positivo	Positivo	Positivo
36	Positivo	Traço	Traço
83	Positivo	Traço	Traço
13*	Positivo	Positivo	Positivo
54	Negativo	Traço	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
71	Positivo	Traço	Traço
48	Positivo	Positivo	Positivo
14	Positivo	Positivo	Positivo
55*	Traço	Negativo	Traço
77	Negativo	Negativo	Negativo
12	Positivo	Positivo	Positivo
66	Traço	Traço	Traço
45	Positivo	Positivo	Traço
49	Negativo	Negativo	Negativo

56	Positivo	Positivo	Positivo
68	Positivo	Positivo	Positivo
21	Negativo	Negativo	Negativo
05	Positivo	Positivo	Positivo
08	Traço	Negativo	Negativo
32*	Positivo	Positivo	Positivo
58	Traço	Traço	Positivo
09	Positivo	Traço	Traço
72	Traço	Traço	Traço
10	Traço	Positivo	Traço
64	Traço	Negativo	Negativo
73	Positivo	Positivo	Positivo
07	Positivo	Positivo	Positivo
84	Positivo	Positivo	Positivo
01	Negativo	Traço	Negativo
59	Traço	Positivo	Traço
46	Traço	Traço	Traço
34	Traço	Negativo	Negativo
30	Traço	Traço	Traço
52	Positivo	Positivo	Positivo

*urina com hematúria.

Quando comparadas as metodologias utilizadas no diagnóstico dos escolares foi verificado que do total de 42 crianças analisadas pelo POC-CCA, 18 (42,8%) tiveram resultado positivo. Já nos testes de WB-MAMA e Helmintex não foi encontrado nenhum caso positivo (Tabela V).

Tabela V – Resultado geral de todos os métodos aplicados.

Nº Identificação	POC-CCA	WB-MAMA	Helmintex
03	Positivo	-	Não cedeu amostra
15*	Negativo	-	-
65	Positivo	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo	-
76	Negativo	Negativo	-
57	Positivo	Negativo	Negativo
23	Positivo	-	Negativo
75	Positivo	Negativo	Negativo
36	Traço	Negativo	-
83	Traço	Negativo	-
13*	Positivo	-	Negativo
54	Negativo	Negativo	-
17	Negativo	-	-
71	Traço	Negativo	-
48	Positivo	-	Negativo
14	Positivo	-	Negativo
55*	Traço	Negativo	-
77	Negativo	Negativo	-
12	Positivo	-	Não cedeu amostra
66	Traço	Negativo	-
45	Positivo	Negativo	Não cedeu amostra
49	Negativo	Negativo	-
56	Positivo	Negativo	Negativo
68	Positivo	Negativo	Negativo
21	Negativo	-	-
05	Positivo	-	Negativo
08	Negativo	-	-
32*	Positivo	-	Negativo
58	Traço	Negativo	-
09	Traço	-	-
72	Traço	Negativo	-
10	Traço	-	-

64	Negativo	Negativo	-
73	Positivo	Negativo	Não cedeu amostra
07	Positivo	-	Negativo
84	Positivo	Negativo	Não cedeu amostra
01	Negativo	-	-
59	Traço	-	-
46	Traço	-	-
34	Negativo	-	-
30	Traço	-	-
52	Positivo	-	Não cedeu amostra

4.4. Comparação das metodologias utilizadas para diagnóstico de esquistossomose na escola Trindade, Vila Pedreira, Esteio.

Os métodos POC-CCA e Helmintex não obtiveram concordância em nenhum momento. Em treze casos os resultados foram positivos no POC-CCA, enquanto que no Helmintex foram negativos (Tabela VI).

Quando se comparou os testes POC-CCA e WB-MAMA, em 16 casos o resultado foi positivo no POC-CCA e negativo no WB-MAMA. E em seis casos os dois métodos concordaram no resultado negativo (Tabela VII).

Já na comparação dos métodos Helmintex e WB-MAMA, somente em cinco casos houve concordância de casos negativos (Tabela VIII).

Tabela VI – Comparação dos métodos POC-CCA e Helmintex.

POC-CCA			
HELMINTEX	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	13	0	13
Total	13	0	13

Tabela VII – Comparação dos métodos POC-CCA e WB-MAMA.

POC-CCA			
WB-MAMA	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	16	6	21
Total	16	6	21

Tabela VIII – Comparação dos métodos Helmintex e WB-MAMA.

HELMINTEX			
WB-MAMA	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	0	5	5
Total	0	5	5

5. DISCUSSÃO:

De acordo com o Ministério da Saúde (2014) é fundamental o monitoramento dos casos em áreas focais, assim como seu controle. Por isso o desenvolvimento e aperfeiçoamento de medidas de controle para a interrupção da transmissão da esquistossomose vêm sendo estudada pelo Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS (GPBP), que acompanha há dezoito anos o foco de esquistossomose em Esteio, Rio Grande do Sul.

Em Esteio existiam dois principais focos de transmissão: o primeiro, Banhado do Azeite, foi drenado e aparentemente deixou de ter transmissão, não sendo o objetivo deste estudo. O segundo, a área do Valo da Três Portos (também chamada área do “Seu Remi”), passou a ser o foco mais importante, com os últimos casos de infectados diagnosticados (Tabela III). A área localizada aos fundos do Parque de Exposições e também na área chamada “Fazenda Kroeff”, nunca foi confirmada como foco de transmissão embora houvesse existência de *B. glabrata* e indicações de frequência de pessoas com esquistossomose confirmada, sendo a maioria destes moradores provenientes da Vila Pedreira (Tabela II).

Foram encontradas algumas dificuldades no levantamento e atualização dos dados dos 28 casos antigos da infecção. A esquistossomose não é vista pela população como um problema, não dando a devida importância à realização de exames diagnósticos e prevenção da infecção. Um fator positivo foi a presença constante do GPBP que há anos vem acompanhando os casos na região, estabelecendo uma boa relação de confiança com a população residente nos locais estudados.

Um fator particular na localização dos indivíduos que residiam na área do Valo da Três Portos (VTP) foi a situação social crítica deste local. Desavenças entre facções rivais, que culminaram no assassinato de um dos líderes da comunidade, acabaram expulsando os moradores do local. Na área onde viviam aproximadamente 70 pessoas, em outubro de 2015, restaram apenas 9 indivíduos. A partir do início de 2016, provavelmente nenhum morador permanecerá no local, pois a área foi vendida e servirá para empreendimento industrial ou comercial. Aos fundos da área uma transformação radical foi a construção da BR-448 (Figura 12), que ocupou e transformou cerca de 40 metros do comprimento da área, bem como cortou totalmente o trânsito de pessoas. Desta maneira tornou-se mais difícil a comunicação com os que já não residiam na área do VTP.

Ficaram evidentes também alguns problemas da intersetorialidade. Houve dificuldade de comunicação entre as Secretarias Municipais de Saúde e de Educação do município de Esteio, bem como na concretização do planejamento de atividades dentro da Escola Trindade.

Nos encontros pessoais com os antigos casos diagnosticados de esquistossomose foram realizadas as coletas de sangue e também conversas informais. Ao serem questionados se ainda frequentavam as áreas dos antigos focos, todos responderam que não. Em um estudo realizado por Coelho (2010), 39,5% dos indivíduos que disseram não ter contato com água contaminada estavam infectados. Vale lembrar que podem existir deficiências de memória quando se aplica um questionário, ou mesmo em perguntas informais, como a falta da lembrança do contato esporádico ou até mesmo não querer contar a verdade por saberem se tratar de uma prática que deve ser evitada.

Esse comportamento já é estudado em pesquisas antropológicas, e deve-se levar em conta ao analisar os resultados desses questionários (Boebs *et al.*, 2007).

A confirmação diagnóstica dos casos de Esteio sempre foi um desafio, visto que a carga parasitária é muito baixa e a eliminação de ovos nas fezes é pequena (Graeff-Teixeira *et al.*, 2004). A variabilidade de exames realizados no período de 1997 a 2015 foi devido a diferentes necessidades do GPBP e da Secretaria de Saúde de Esteio. Inicialmente eram feitos apenas exames de fezes, após houve a entrada de testes sorológicos, como imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio enzimático (ELISA). O método utilizado nesse trabalho foi o de Western-blot (WB) com o antígeno microssomal do verme adulto de *S. mansoni* (MAMA), indicado pelo “*Center for Diseases Control and Prevention*”, CDC, Atlanta, EUA. Alguns inquéritos sorológicos utilizando antígeno microssomal de verme adulto já foram utilizados em países que estão em fase de eliminação da esquistossomose. Em 2011, em estudo publicado por Amarir *et al.*, foi utilizado um ensaio de imunoeletrotransferência com o antígeno microssomal de *S. haematobium* (HAMA) para monitorar o status epidemiológico em cinco áreas de focos antigos de esquistossomose. Este estudo obteve como resultado nenhum caso positivo e a transmissão de esquistossomose no Marrocos foi considerada interrompida.

Dos 28 indivíduos com histórico de esquistossomose, quatro tiveram resultado positivo no WB-MAMA. Para esses quatro indivíduos foram solicitadas amostra para realização de exame de fezes pelo método Helmintex. Em apenas um caso a amostra foi cedida, e o resultado foi negativo. Vale ressaltar que os casos de Esteio além de possuírem baixa carga parasitária, o que resulta em pouca eliminação de ovos nas fezes, a oviposição da fêmea de *S. mansoni* é intermitente, ou seja, oscila dia-a-dia (Rey,

2001). Isso pode interferir no resultado do exame de apenas uma amostra. O ideal seria, nessas situações, fazer análise de três amostras colhidas em dias diferentes, aumentando assim a sensibilidade da busca. Através experiência prévia estudando estas populações, a obtenção das três amostras pode levar tempo, por dificuldades de todo o tipo: horários de trabalho; falta de motivação; esquecimento de coletar a amostra; necessidade de manter um esquema de busca ativa das amostras, que cumpra o combinado e que se mantenha por longo tempo (por exemplo, com o setor de transportes da Prefeitura); indivíduos com hábito intestinal irregular; situação familiar ou socioeconômica; usuários de drogas.

A área da Vila Pedreira, onde viviam sete dos vinte oito dos casos diagnosticados em Esteio, é composta por uma população com uma organização social melhor estabelecida, especialmente em torno da escola Trindade (Figura 5). Mesmo com episódios de crises sociais e confrontos dos elementos do tráfico de drogas, este aspecto facilitou a realização do trabalho com as crianças da comunidade.

Uma forma de alcançar uma família por completo é a realização de atividades de educação em saúde nas escolas, visto que as crianças se tornam vetores dessas informações. Em estudo de Massaro e colaboradores (2006), foi demonstrado que crianças em idade escolar têm o poder de multiplicar e transmitir o conhecimento aprendido a outros membros da família. Assim como a existência de um indivíduo infectado numa família aumenta a probabilidade de encontrar outro integrante infectado (Enk *et al.*, 2008). Em nosso estudo podemos perceber que atividades integradas de educação e saúde extrapolam o ambiente escolar, atingindo a população como um todo, visto que as crianças relataram aos seus pais e familiares o que haviam aprendido na

escola, até mesmo a cerca da necessidade e da importância de realizar exames laboratoriais.

A segunda etapa desse trabalho na população da escola de VP consistiu na coleta de amostras de sangue e urina nos escolares. A análise da urina demonstrou 42,8% de casos positivos, enquanto que na sorologia por WB-MAMA não foi detectado nenhum caso. O número alto de exames positivos pelo POC-CCA, sem confirmação pela sorologia e pelo método Helmintex, nos leva a crer em resultados falso-positivos pelo método imunocromatográfico de detecção de antígenos na urina.

Em estudo realizado em uma área não endêmica no Quênia, onde foram comparados testes de KK e POC-CCA, os resultados sugerem que ensaios utilizando POC-CCA podem ser utilizados para o mapeamento inicial de infecções por *S. mansoni*, visto que o POC-CCA indicou níveis de prevalência mais elevados que o KK. Resultados falso-positivos foram relatados apenas no pós-tratamento, onde foram registrados exames positivos para POC-CCA e negativo para KK. Os autores justificaram a diferença de resultados serem em relação a infecções ainda existentes, leves e em vias de eliminação (Mwinzi *et al.*, 2015). Já em estudo realizado por Silveira *et al.* (2016), em Minas Gerais, demonstrou que embora testes de POC-CCA tenham bom desempenho para diagnóstico de esquistossomíases, nas áreas que possuem leves intensidades de infecção, o método não tem sensibilidade para ser utilizado como ferramenta de diagnóstico independente. Ainda foi levantada uma questão importante, como os resultados considerados “traços” influenciam na sensibilidade do teste.

Em nosso estudo foi verificada dificuldade na interpretação do POC-CCA quando a banda é muito fraca e incompleta, o que caracterizou o resultado denominado “traço” e

que pode produzir uma variabilidade inter-observadores, como pode ser observado na tabela IV. Deve-se considerar que este não seria um grande problema no monitoramento de áreas em eliminação da transmissão, já que resultados considerados “traço” deveriam ou poderiam ser tratados como positivos, com o objetivo de não deixar de fora nenhum indivíduo que possa estar eliminando ovos nas fezes. Estes resultados, mesmo que “falso-positivos” justificariam o tratamento, levando em consideração o objetivo de eliminar a transmissão, numa particularidade da proposta de tratamento coletivo. O problema começa a crescer com o tamanho do grupo de indivíduos com resultados “falso-positivos”. Isto pode ter implicações políticas e criação de resistência ao uso dos métodos, pois os governos municipais não se sentiriam-se confortáveis com exames “positivos” numa situação em que a interrupção da transmissão pode render dividendos políticos.

A negatividade dos métodos WB-MAMA e Helmintex corroboram com a hipótese mais provável nessa população de escolares, pois existem vários indícios de que a transmissão possa ter sido interrompida: nenhum novo caso em demanda espontânea na rede de saúde do município; as mudanças dramáticas no ambiente e na população dos dois focos que poderiam ainda estar transmitindo (VTP e Fazenda Kroeff). Além disso, em conversas com alguns moradores, pais das crianças e até mesmo com as crianças, há uma consciência do risco e uma reforçada imagem negativa de atividades junto aos banhados próximos ao rio dos Sinos.

Comprovou-se também algo reconhecido há tempo sobre a aceitabilidade dos métodos diagnósticos pela população: a obtenção de amostras de fezes é muito mais difícil quando comparada com amostras de sangue e urina. Será lamentável a confirmação em estudos ampliados, de um desempenho precário de métodos *point-of-*

care utilizando urina na identificação de indivíduos infectados com baixas cargas parasitárias, pois o teste alia vários elementos desejáveis para seu uso como instrumento de verificar a permanência de transmissão: fácil obtenção (urina), simples execução (podendo ser feito na hora, logo após a coleta).

6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS:

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de atualizar e explorar os indicadores de interrupção da esquistossomose em Esteio, Rio Grande do Sul. Todavia, ainda permanece a necessidade de alguns esclarecimentos, como a situação de reatividade do método POC-CCA na população estudada e cujos resultados ora relatados necessitam da extensão dos estudos além do que foi apresentado.

Além disso, a repetição de amostras de fezes para exame pelo método Helmintex é ainda mais importante, pois a eliminação de ovos pode ser intermitente e a ausência de ovos num dia pode se associar a presença de ovos na evacuação do dia seguinte (Rey, 2001).

A população de idade escolar precisa ser avaliada em seu total, principalmente crianças maiores, mais independentes e com maior risco, pela facilidade de comparecer á área da Fazenda Kroeff, por exemplo, mesmo com as modificações ambientais em curso (obra da rodovia BR 448 e construção de condomínios).

Existe uma razoável possibilidade da interrupção de transmissão da esquistossomose no município de Esteio. Entretanto, a tarefa de certificar esta interrupção depende da continuidade do monitoramento por muitos anos e de definições quanto aos métodos mais adequados para esta finalidade.

7. REFERÊNCIAS

- Adriko M, Standley CJ, Tinkitina B, Tukahebwa EM, Fenwick A, Fleming FM, et al. (2014). Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings with in Bugiri District, Uganda. *Acta Trop.* 2014;136:50–7.
- Amarir F, El Mansouri B, Fellah H, Sebtii F, Lakranbi M, Laamrani El Idrissi A, Sadak A, Rhajaoui M (2011). National Serological Survey of *Haematobium* Schistosomiasis in Morocco: arguments to explain the elimination. *Am J Trop Med Hyg* 2011, 1: 15-19.
- Bardiale GB, Brandão DF, Ribeiro-Silva A (2006). Esquistossomose endocervical. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 38(4): 351-352.
- Bell DR (1963). A new method for counting *S. mansoni* eggs in faeces. *Bull. Org. mond. Santé, Bull. Wld Hlth Org*; 29: 525-530.
- Boebs AE, Monticelli M, Wosny AM, Heidemann IBS, Grisotti M (2007). A interface necessária entre enfermagem, educação em saúde e o conceito de cultura. *Texto Contexto Enferm.* Florianópolis; 16(2): 307-14.
- Brasil. Ministério da Saúde (2005). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica/Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 6o ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- Brasil. Ministério da Saúde (2014). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde.
- Caldeira K, Teixeira CF, Silveira MB, Fries LCC, Romanzini J, Bittencourt HR, Graeff-Teixeira C (2012). Comparison of the Kato- Katz and Helminex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low intensity transmission focus in Bandeirantes,

Paraná, southern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 107(5):690-692.

Candido RRF, Favero V, Duke M, Karl S, Gutierrez L, Woodward RC (2014). The affinity of magnetic microspheres for *Schistosoma* eggs. International Journal for Parasitology; 45(1).

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (2008). *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; p.897.

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

Coelho KR (2010). Infecções pelo *Schistosoma mansoni* em estudantes como indicador da infecção na população em área rural de alta prevalência. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, Minas Gerais.

Coelho PMZ, Jurberg AD, Oliveira AA, Katz N (2009). Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. Memórias Instituto Oswaldo Cruz; 104(5):720-723.

Colley DG, Binder S, Campbell C, King CH, Tchuem Tchuente LA, N'Goran EK, et al. (2013). 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;88(3): 426–432.

Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH (2014). Human schistosomiasis. Lancet. 28;383(9936):2253–64.

Coulibaly JT, Knopp S, N'Guessan NA, Silue KD, Furst T, Lohourignon LK, et al. (2011). Accuracy of urine circulating cathodic antigen (CCA) test for *Schistosoma mansoni* diagnosis in different settings of Cote d'Ivoire. PLoS Negl Trop Dis; 5: e1384

Doenhoff MJ, Butterwoeth AE, Hayes RJ, Sturrok RF, Ouma JH, Koech D, et al. (1993). Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using

crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 87:42-48.

Enk, M. J. et al. (2008). A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, United States, v. 78, n. 1, p. 140-146.

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

Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CK, Salvany AM, Brum CO, Maurer RL, Ben R, Mardini LBLF, Jobim MB, Amaral RS (2004). The Initial Epidemiological Studies in the Low Endemicity Schistosomiasis Area in Esteio, Rio Grande do Sul, the Southernmost Brazilian State, 1997 to 2000. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 99: 73-78.

Gray DJ, Ross AG, Li Y-S, Macmanus DO (2011). Diagnosis and management of schistosomiasis. BMJ Clinical Review; 342:d2651.

Grimes JET, Croll D, Harrison WE, Utzinger J, Freeman MC, Templeton MR (2014). The relationship between water, sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis; 8:e3296.

Guimarães MT, Melo-Junior MR, Costa Silva RB, Cavalcante CBL, Beltrão EIC (2008). Comparative study on carbohydrate on expression. In hepatic egg-granuloma. Revista do Instituto Adolfo Lutz; 67(1):59-63.

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

- Hinrichsen SC (2005). Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1º edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- Hoffman WA, Pons JA, Janer JL (1934). Sedimentacion Concentration Method in *Schistosomiasis mansoni*. J Trop Med Hyg; 9:283-298.
- Karl S, Gutierrez L, Lucyk-Maurer R, Kerr R, Candido RRF, et al. (2013). The iron distribution and magnetic properties of schistosome eggshells: implications for improved diagnostics, PLoS NTD 7(5): e2219.
- Katz N (2008). The Discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brasil. Acta tropica;108: 69-71.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J (1972). A simple devise for quantitative stool thick-smear technique in *schistosomiasis mansoni*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 14:397-400.
- Lier T, Simonsen GS, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Vennervald BJ, Johansen MV (2006). Novel real-time PCr for detection of *Schistosomajaponicum* in stool. Southeast Asian J Trop Med Public Health; 37:257-264.
- Massara, C. L. et al. (2006). Evaluation of an improved approach using residences of schistosomiasis-positive school children to identify carriers in an area of low endemicity. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, United States, v. 74, n. 3, p. 495-499.
- Mwinzi PN, Kittur N, Ochola E, Cooper PJ, Campbell CH Jr., King CH, et al. (2015). Additional evaluation of the Point-of-Contact Circulating Cathodic Antigen assay for *Schistosoma mansoni* infection. Front Public Health;3:48.
- Neto VA, Gryschek RCB, Amato VS, Tuon FF (2008). Parasitologia. Uma abordagem clínica. 1º edição. São Paulo: Editora Elsevier; p176-184.
- Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA (2010). Parasitologia Humana. 11º edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; p 193-212.

- Pereira, A. P. B. et al. (2010). The prevalence of schistosomiasis in school-aged children as an appropriate indicator of its prevalence in the community. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 563-569.
- Pinheiro, MCC (2010). Avaliação de três métodos coproscópicos para diagnóstico da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade no estado do Ceará. Dissertação (Mestrado)- Pós – Graduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza.
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A (2002). Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. Am J Trop Med Hyg; 66:157-162.
- Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A (2003). Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 68:652-656.
- Prata A (2008). Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 41(6):689-691.
- Rey L (2001). Parasitologia. 3ªed. Ed. Guanabara Koogan. p 413-441.
- Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuem Tchuente L A, Garba A, et al. (2013). Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. Acta Trop; 128: 423–440.
- Ruppel A, Idris MA, Sulaiman SM, Hilali AM (1990). *Schistosoma mansoni* diagnostic antigens (Sm 31/12): a sero-epidemiological study in the Sudan. Trop Med Parasitol; 41:127-130.
- Silveira AMS, Costa EGD, Ray D, Suzuki BM, Hsieh MH, Fraga LAO, et al. (2016). Evaluation of the CCA Immuno-Chromatographic Test to Diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis.

- Souza PC, Vitorino RR, Costa AP, Farina FCJ, Santana LA, Gomes AP (2011). Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista Brasileira de Clínica de Medicina*;300-307.
- Sulahian A, Garin YJF, Izri A, Verret C, Delaunay P, Gool T, Derouin F (2005). Development and Evaluation of a Western Bolt Kit for Diagnosis of Schistosomiasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* ;548-551.
- Teixeira CF. (2011). Otimização dos métodos de diagnóstico da esquistossomose mansônica em áreas de baixa endemicidade. 89p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.
- Teixeira CF, Neuhauss E, Ben R, Romanzini J, Teixeira CG (2007). Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Tsang VC, Hancock K, Kelly MA, Wilson BC, Maddison SE (1983). *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. II. Specificity of antibody responses to the *S. mansoni* microsomal antigen (MAMA). *Journal of Immunology*; 130:1366-1370.
- Valli LCP, Kanamura HY, Da Silva RM, Ribeiro-Rodrigues R, Dietze ADR (1999). Schistosomiasis *mansoni*: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. *Am J Trop Med Hyg*; 61:302-307.
- Utzinger J, Booth M, N’Goran EK, Muller I, Tanner M, Lengeler C (2001). Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of *Schistosoma mansoni* before and after treatment with praziquantel. *Parasitology*; 122 :532-544.
- Van Dam GJ, Wichers JH, Ferreira TM, Ghati D, Van Amerongen A, Deelder AM (2004). Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *J Clin Microbiol*; 42:5458-5461.

- Zicker F, Katz N, Wolf J (1977). Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansônica. *Revista de Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*; 19(3): 202-207.
- WHO. World Health Organization, (1985). *The Control of Schistosomiasis*. Geneva: WHO. (Technical Report Series, 728)
- WHO. World Health Organization, (2009). *Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas; Report of a WHO informal consultation*. 2009.
- WHO. World Health Organization. (2013). *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases*. Geneva: World Health Organization.
- Williams P, Coelho PMZ (1975). Attraction of snail to betalights. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 67: 616-617.
- Woodstock L, Cook JA, Peters PA, Warren KS (1971). Random Distribution of Schistosome Eggs in the Feces of Patients with *Schistosomiasis mansoni*. *Journal Infect Dis*; 124(6):613-614.

ANEXO

8.1. Artigo submetido a “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”



**Update on the follow-up of *S.mansoni*-infected individuals
in Esteio, southern Brazil**

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:	Ramírez, Angélica; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversityPontifícia Lindholz, Catieli; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversityPontifícia Candido, Renata ; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversityPontifícia Teixeira, Carlos; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ecology and biodiversityPontifícia
Keyword:	Schistosomiasis, low-endemicity, interruption of transmission
Theme:	Schistosomiasis, Parasitology, Helminthiasis, Infectious Disease, Disease control

1
2
3
4 1 *Short Communication*

5
6 2 Running Title: Schistosomiasis in Esteio RS

7
8
9 3 **Update on the follow-up of *S.mansoni*-infected individuals in Esteio,**
10
11
12 4 **southern Brazil**

13
14
15 5 Angélica da Paz Ramírez, Catieli Gobetti Lindholz, Renata Russo Frasca Candido, Carlos
16
17 6 Graeff-Teixeira

18
19
20
21 7 Grupo de Parasitologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
22
23 8 Sul, Avenida Ipiranga 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

24
25
26
27 9 _____

28
29
30 10 **Corresponding author:** C.Graeff-Teixeira, Graeff.teixeira@gmail.com, 5551 9981
31
32 11 8599.

33
34
35
36 12 **Abstract:** We update survey results and monitoring of 28 schistosomiasis-infected
37
38 13 individuals in Esteio, Brazil, and their current dwelling-place. From 1997 to 2011, 28
39
40 14 individuals were found infected and have been examined both by parasitological and
41
42 15 several serological methods. The original dwelling-place of each infected individual
43
44 16 varied along time and clearly indicated a remaining transmission activity in “Valo da Três
45
46 17 Portos” up to 2011, but that is an area currently almost depopulated because of conflicts
47
48 18 and ownership change. Only 5/28 individuals remain living in their original dwelling-
49
50 19 place. Certification of transmission interruption requires long-term, combined
51
52 20 surveillance strategies and better diagnostic tools.

53
54
55
56
57
58 21 **Key-words:** schistosomiasis; low-endemicity; transmission interruption.
59
60

1
2
3
4 22 Brazil's schistosomiasis main endemic area includes 6 northeastern States and the
5
6
7 23 State of Minas Gerais. Next to the border with Uruguay and Argentina, the State of Rio
8
9 24 Grande do Sul has been considered schistosomiasis-free. *Biomphalaria glabrata* was first
10
11 25 identified in Esteio in 1997, after the diagnosis of schistosomiasis in an hospitalized adult
12
13
14 26 man with hepatitis (Carvalho *et al.*, 1998). One year later, active transmission was
15
16 27 documented by finding snails infected with *Schistosoma mansoni* (Graeff-Teixeira *et al.*,
17
18 28 1999), simultaneously with the detection of a second infected individual. From 1997 to
19
20
21 29 2000, 11 human infections have been diagnosed in Esteio (Graeff-Teixeira *et al.*, 2004).
22
23 30 Other 17 individuals were found infected from 2001 and 2011. The objective of this Note
24
25 31 is to report and update the diagnosis of schistosomiasis in Esteio, and the current
26
27 32 dwelling-place of individuals found infected up to 2010.

28
29
30 33 The archives of the Laboratory of Molecular Parasitology were reviewed to show
31
32 34 the succession of different diagnostic methods applied along time, as well as the follow-
33
34 35 up in many individuals with repeated examinations (Figure 1). This study was approved
35
36 36 by the Ethics Committee: CAAE 18944614.3.0000.5336. From 1997 to 2015, egg
37
38 37 detection led to diagnosis of 28 infections: Kato-Katz method (Kato-Katz *et al.*, 1972)
39
40 38 was positive in 4 individuals: numbers 2, 7, 8, 9 (see Figure 1) and only a modification
41
42 39 of HPJ (Hoffman *et al.*, 1934) (examination of progressively larger fecal mass) and
43
44 40 Helmintex (Teixeira *et al.*, 2007) resulted positive in all individuals. Serological surveys
45
46 41 or individual testing were performed with several methods: indirect immunofluorescence
47
48 42 (IFI) (Kanamura *et al.*, 1979) in 1999, IgA and IgG SEA-ELISA (Doenhoff *et al.*, 1993)
49
50 43 in 2001 and IgG immunoblot with *S.mansoni* microsomal antigen (MAMA) (Tsang *et*
51
52 44 *al.*, 1983). Table 1 shows the original dwelling-place of patients: they were living in three
53
54 45 areas in Esteio: Vila Pedreira (VP), Novo Esteio (NE) and Valo da Tres Portos (VTP);
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 46 since 2003 new cases came especially from VTP, none from VP, what is consistent with
5
6
7 47 the hypothesis of VTP being the remaining area with transmission. Table 2 summarizes
8
9
10 48 the information on the current dwelling-place of patients: from 10 individuals the
11
12 49 information was not available while only 5 were living in the same place and 13 have
13
14 50 moved away (inbounds Esteio: 1 or outbounds Esteio: 12). Mobility of people is a big
15
16 51 challenge for the follow-up as here illustrated.

17
18
19 52 Esteio had one suspected, Fazenda Kroeff (FK) and three confirmed transmission
20
21 53 foci: Banhado do Azeite (BA), Casa dos Trilhos (CT) and Valo dos Três Portos (VTP).
22
23 54 FZ, BA and CT had huge environmental modifications, including a road construction
24
25
26 55 what most probably have contributed to transmission interruption. VTP was the last focus
27
28 56 with very active transmission, but people living there (70 in 2013) is moving away and
29
30 57 the land is being prepared for building a warehouse. It is possible that *S.mansoni*
31
32 58 transmission has already been interrupted in Esteio, but only long-term monitoring, both
33
34 59 human and snail populations, will provide data to confirm interruption.
35
36
37
38
39

40 **References**

- 41
42 62 Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL 1998. First report of *Biomphalaria glabrata* in the
43
44 63 state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 39-40.
45
46
47 64 Doenhoff MJ, Butterwoeth AE, Hayes RJ, Sturrok RF, Ouma JH, Koech D, et al. 1993.
48
49 65 Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and
50
51 66 purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. *Trans R Soc Trop Med*
52
53 67 *Hyg* 87:42-48.
54
55
56 68 Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBS, Valar C, Moraes
57
58 69 C, Garrido C, Amaral RS 1999. Identification of a transmission focus of
59
60

- 1
2
3
4 70 *Shistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. *Mem*
5
6
7 71 *Inst Oswaldo Cruz* 94: 9-10.
8
9 72 Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CK, Salvany AM, Brum CO, Maurer RL, Ben R,
10
11 73 Mardini LBLF, Jobim MB, Amaral RS 2004. The Initial Epidemiological Studies
12
13 74 in the Low Endemicity Schistosomiasis Area in Esteio, Rio Grande do Sul, the
14
15 75 Southernmost Brazilian State, 1997 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-78.
16
17
18 76 Hoffman WA, Pons JA, Janer JL 1934. Sedimentation Concentration Method in
19
20 77 *Schistosomiasis mansoni*. *J Trop Med Hyg* 9:283-298.
21
22
23 78 Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, Camargo ME, Silva LC 1979. Class specific
24
25 79 antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of
26
27 80 schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 28:242-248.
28
29
30 81 Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear
31
32 82 technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14:397-400.
33
34
35 83 Teixeira CF, Neuhauss E, Ben R, Romanzini J, Teixeira CG 2007. Detection of
36
37 84 *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic
38
39 85 beads in a magnetic field. *PLoS NTD* 1: e73.
40
41
42 86 Tsang VC, Hancock K, Kelly MA, Wilson BC, Maddison SE 1983. *Schistosoma mansoni*
43
44 87 adult microsomal antigens, a serologic reagent. II. Specificity of antibody responses
45
46 88 to the *S. mansoni* microsomal antigen (MAMA). *J Immunol* 130:1366-1370.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

90 Table 1: Distribution of 28 schistosoma-infected individuals (dots) according to their
91 original dwelling-place, in Esteio, RS, Brazil: Vila Pedreira (VP), Novo Esteio (NE),
92 Valo da Três Portos (VTP), from 1997 to 2011 (no new diagnoses after 2011)

	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11
VP	••			••		•	••								
NE		•••		•	•	•	••					•		•	
VTP		•		••							•••		••	••	•

93
94

For Review Only

95 Table 2: Distribution of 28 schistosomiasis-infected individuals (1997-2011) according to
96 updated (2015) dwelling-place, in Esteio, RS, Brazil

97

Localization	Individuals	
Known location		18
Same	5	
Different, outbounds Esteio	12	
Different, inbounds Esteio	1	
Unknown		10
Total	18	28

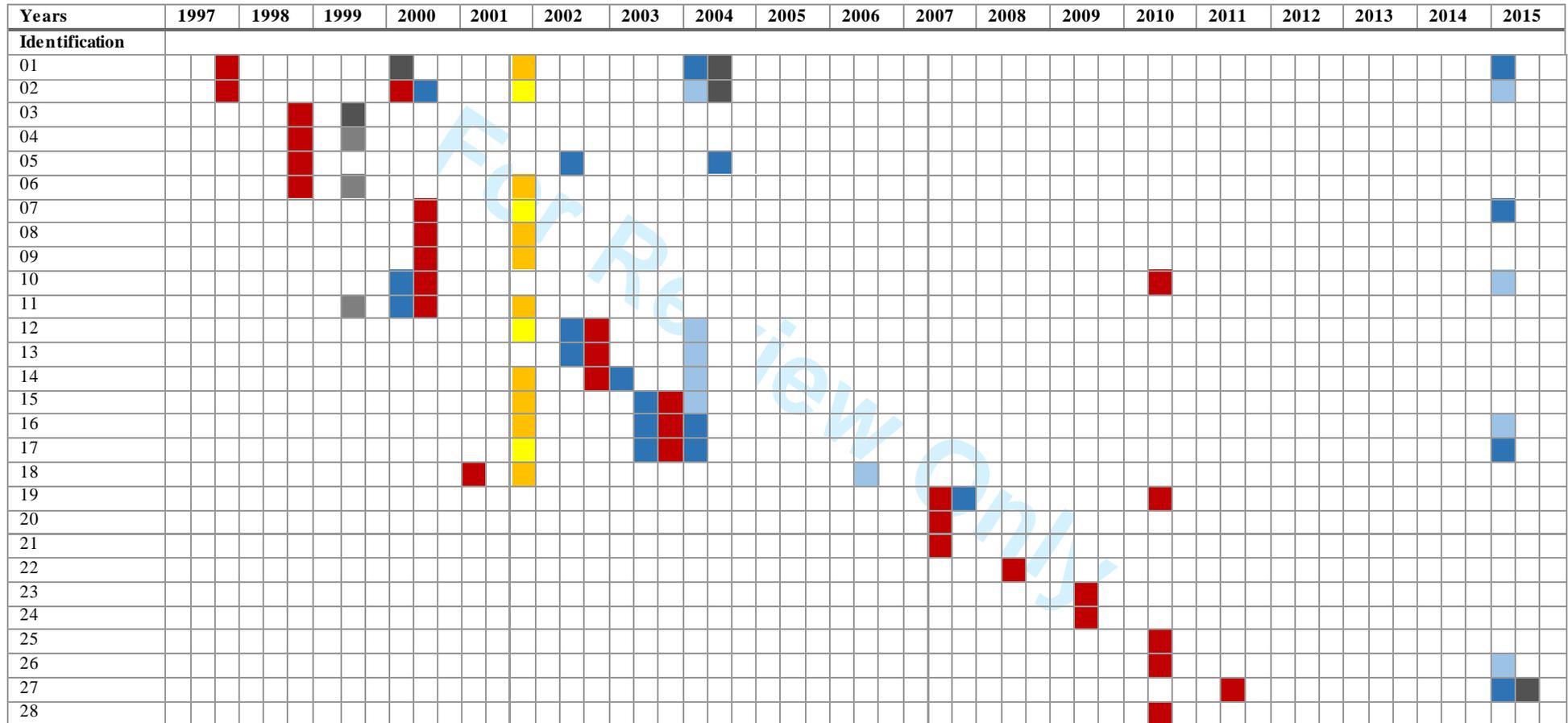
FOR Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

98

For Review Only

Figure 1 - Description of the test results performed individuals diagnosed with schistosomiasis between January 1997 and December 2015, in Esteio, Rio Grande do Sul.



Legends: Stool positive Stool negative ELISA IgA e IgG positive ELISA IgG positive RIFI positive WB-MAMA positive WB-MAMA negative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

For Review Only