

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Avaliação de uma proteína de *Schistosoma mansoni* como antígeno em um novo teste de  
imunodiagnóstico da esquistossomose**

**por**

**Gabriela de Oliveira**

**Belo Horizonte**

**2020**

**DISSERTAÇÃO D/MCS-IRR G. OLIVEIRA 2020**

**GABRIELA DE OLIVEIRA**

**Avaliação de uma proteína de *Schistosoma mansoni* como antígeno em um novo teste de imunodiagnóstico da esquistossomose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Coorientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca

**Belo Horizonte**

**2020**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 3740/0

O41a  
2020

Oliveira, Gabriela de.

Avaliação de uma proteína de *Schistosoma mansoni* como antígeno em um novo teste de imunodiagnóstico da esquistossomose / Gabriela de Oliveira. – Belo Horizonte, 2020

XV, 113 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 97-107

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose/parasitologia 2. Citometria de fluxo 3. Elisa 4. Testes sorológicos I. Título. II. Pereira, Rosiane Aparecida da Silva (Orientação). III. Fonseca, Cristina Toscano (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Ata da ducentésima trigésima nona defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Gabriela de Oliveira orientada pela Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira e coorientada pela Dra. Cristina Toscano Fonseca.**

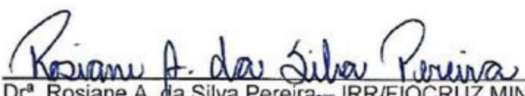
Aos dezoito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às quatorze horas, realizou-se no **Auditório do Ensino situado à Rua Uberaba, 780 – Barro Preto – Belo Horizonte/MG** o exame da ducentésima trigésima nona defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/FIOCRUZ MINAS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática. A dissertação da aluna Gabriela de Oliveira intitula-se "Avaliação de uma proteína de *Schistosoma mansoni* como antígeno em um novo teste de imunodiagnóstico da esquistossomose". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr<sup>a</sup>. Rosiane A. da Silva Pereira – IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientadora/Presidente), Dr. Edward José de Oliveira – IRR/FIOCRUZ MINAS (Titular), e Dr. Rodrigo Dian de O. Aguiar Soares – UFOP (Titular). Após exposição, a candidata foi arguida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

APROVADA


APROVADA CONDICIONALMENTE: Quando o trabalho final necessitar de elaboração adicional ou revisões parciais.

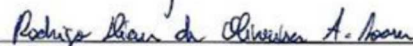
NÃO APROVADA

Uma vez encerrado o exame, eu, Dra. Rosiane A. da Silva Pereira, presidente da banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, 18 de Fevereiro de 2020.



Dr<sup>a</sup>. Rosiane A. da Silva Pereira – IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientadora/Presidente)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Edward José de Oliveira – IRR/FIOCRUZ MINAS (Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rodrigo Dian de O. Aguiar Soares – UFOP (Titular)

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Valéria e Melodivo,  
que sempre me incentivaram e me  
apoiaram em tudo, principalmente  
na vida acadêmica!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por toda a força e bênçãos concedidas para que eu pudesse chegar até aqui!

À minha orientadora Rosiane, por desde 2016 ter me dado a oportunidade de entrar na Fiocruz como aluna de iniciação científica e ter me ensinado o verdadeiro significado de orientação. Obrigada por toda a paciência, dedicação, ensinamentos e convivência durante esse tempo!

À minha coorientadora Kika, por toda a contribuição durante essa jornada. Obrigada pela disponibilidade, e por todos os incentivos e ensinamentos que foram compartilhados, e que levarei por toda a vida!

À Dra. Lis, pelo incentivo e toda a contribuição científica.

À Dra. Andrea Teixeira, colaboradora deste trabalho, e uma pessoa que eu tanto admiro! Obrigada por toda a contribuição, apoio, atenção e ensinamentos.

À Dra. Fernanda Fortes pela convivência e por toda a ajuda e contribuição nos experimentos de citometria de fluxo, e à Dayane, pelo excelente serviço prestado na plataforma de citometria.

Às queridas amigas Priscilla, Poliane, Patty, Dayana, Gardênia, Clarice e Mariana por toda a convivência, por terem tornado essa caminhada mais leve com os nossos momentos de descontração, e também por estarem presentes quando mais precisei. Cada uma de vocês tem um lugar especial em minha vida. Obrigada por tudo!

A todos os colegas do Grupo de Pesquisa em Biologia e Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias por toda a contribuição e convivência.

Aos meus pais, Valéria e Melodivo por nunca deixarem me faltar nada, por sempre terem me incentivado e me apoiado em tudo desde o início. Obrigada pelo amor incondicional e por sempre ouvirem os meus desabafos quando tudo parecia estar perdido, e acima de tudo permanecerem ao meu lado em todos os momentos, e por serem o meu porto seguro!

À Plataforma de Citometria de Fluxo do IRR.

À Coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À Biblioteca do IRR por fornecer acesso à informação técnico-científica.

Aos funcionários do IRR que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

A todos vocês, que de alguma maneira contribuíram e caminharam comigo durante essa jornada, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Obrigada à CAPES e às demais agências financiadoras, FAPEMIG (APQ-01596-16) e CNPq/Fiocruz – PROEP/PEC (PCL 02/17) que tornaram possível a execução deste projeto.

## RESUMO

Apesar dos avanços alcançados nas últimas décadas pelas ações de controle da esquistossomose, a doença ainda permanece como um grave problema de saúde pública mundial. Ainda são necessárias novas intervenções para alcançar a sua eliminação, ou até mesmo o controle da transmissão da doença. Um dos obstáculos para se alcançar a meta de eliminação da doença é a sensibilidade do método de diagnóstico utilizado. Atualmente, o diagnóstico parasitológico pela técnica de Kato-Katz é o recomendado pela OMS. Entretanto, este método apresenta uma baixa sensibilidade na detecção da infecção pelo *S. mansoni*, principalmente em áreas de baixa endemicidade e baixa intensidade de infecção. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, tais como os testes sorológicos, que sejam mais sensíveis e capazes de detectar precisamente as infecções ativas. Nesse contexto, foi selecionada, em um trabalho prévio de imunoproteômica realizado pelo nosso grupo, uma proteína de *S. mansoni*, denominada neste trabalho de PPE, que foi reconhecida exclusivamente pelo soro de indivíduos infectados. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da proteína PPE de *S. mansoni* para compor um novo teste de imunodiagnóstico da esquistossomose quando utilizada em sua forma recombinante. Para isso, a proteína PPE foi expressa em sistema procarioto, em fusão com uma cauda 6xHIS, e purificada a partir da fração solúvel do extrato bacteriano por afinidade com íons de níquel. A proteína recombinante foi obtida com rendimento e níveis de pureza satisfatórios, e se manteve estável por no mínimo sete dias a 4°C e a temperatura ambiente. Além disso, a PPE recombinante manteve o mesmo perfil de reconhecimento antigênico observado anteriormente para a proteína nativa. Em seguida, foi avaliada a reatividade de IgG e IgG4 presentes no soro de indivíduos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* contra a proteína PPE recombinante em ensaios de ELISA e a reatividade de IgG, IgG4 e IgA em ensaios de citometria de fluxo. Nos ensaios de ELISA, a reatividade de IgG foi avaliada utilizando as amostras de soro diluídas 1:40, 1:80 e 1:100. Nestas três diluições foi possível discriminar os indivíduos infectados dos indivíduos não infectados, tanto de área endêmica quanto de área não endêmica para esquistossomose. O teste utilizando as amostras de soro diluídas 1:100 apresentou o melhor desempenho, sendo obtidos os valores de sensibilidade de 88,89%, especificidade de 74,36% e acurácia global AUC = 0,86. Já nos testes de ELISA para análise da reatividade de IgG4 foi possível discriminar os indivíduos infectados apenas dos indivíduos saudáveis de área não endêmica. Nestes testes as amostras de soro foram diluídas 1:80 e 1:100, e apresentaram um desempenho semelhante entre eles, com valores de sensibilidade de 76,47% e 70,59%, especificidade de 79,49% e 82,05%, e acurácia global 0,75 e 0,70, respectivamente. Após confirmar o acoplamento da PPE recombinante às microesferas funcionais, foi avaliada a reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA em ensaios de citometria de fluxo. Nos testes realizados com IgG e IgG4 foi possível diferenciar os indivíduos infectados dos indivíduos não infectados, de área endêmica e de área não endêmica para esquistossomose. Entretanto, o teste com IgA não foi capaz de discriminar entre os indivíduos infectados e não infectados de área endêmica. Dentre os três testes realizados, o que avaliou a reatividade de IgG4 contra a PPE apresentou melhor desempenho, com valores de sensibilidade de 90,91%, especificidade de 80% e acurácia global AUC = 0,90. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a proteína PPE recombinante é um antígeno promissor para ser utilizado no diagnóstico sorológico da esquistossomose e que os testes desenvolvidos têm potencial para serem utilizados no diagnóstico acurado da doença.

**Palavras-chave:** Diagnóstico sorológico, esquistossomose, ELISA, citometria de fluxo.



## ABSTRACT

Despite the advances in schistosomiasis control over the last decade, the disease remains a serious public health problem worldwide. New interventions are still needed to achieve disease elimination, or even to control its transmission. One of the obstacles is the sensitivity of the diagnostic method used. Currently, the parasitological diagnosis using the Kato-Katz method is recommended by the WHO. However, this method presents low sensitivity in the detection of *S. mansoni* infection when used in areas of low endemicity and low intensity of infection. Therefore, it is necessary to develop new diagnostic tests, such as serological tests, capable of detecting active infections with higher sensitivity. In this context, in a previous immunoproteomics study carried out by our group, a *S. mansoni* protein, named in this study as PPE, was selected due to its recognition exclusively by the serum of infected individuals. Thus, the purpose of this study was to evaluate the potential of the recombinant *S. mansoni* PPE protein as an antigen to compose a new immunodiagnostic test for schistosomiasis. For this, the PPE protein was expressed in prokaryotic system, fused to a 6xHIS tag, and purified from the soluble fraction of the bacterial extract by its affinity to nickel ions. The recombinant protein was obtained with satisfactory yield and purity levels and remained stable for at least seven days at 4°C and at room temperature. In addition, the recombinant PPE showed the same antigen recognition profile previously observed for the native protein. Then, the reactivity of IgG and IgG4 against the recombinant PPE protein was evaluated in ELISA, and the reactivity of IgG, IgG4 and IgA, in flow cytometry assays using sera from individuals infected and not infected by *S. mansoni*. In ELISA assays, the reactivity of IgG was evaluated at the serum dilutions 1:40, 1:80 and 1: 100. In these three dilutions, it was possible to discriminate infected individuals from non-infected individuals, from both endemic and non-endemic areas for schistosomiasis. The assay performed at 1:100 serum dilution showed the best performance, with 88.89% sensitivity, 74.36% specificity and global accuracy AUC = 0.86. IgG4 reactivity against recombinant PPE could also discriminate infected individuals from healthy individuals from non-endemic areas but could not differentiate infected individuals from the non-infected one living in endemic areas for schistosomiasis. In these assays, serum samples were diluted 1:80 and 1: 100, and showed similar performance between them, with 76.47% and 70.59% sensitivity, 79.49% and 82.05% specificity, and overall accuracy of 0.75 and 0.70, respectively. After validating the conjugation of the recombinant PPE to the functional beads, the reactivity of the immunoglobulins IgG, IgG4 and IgA against the recombinant protein was evaluated in the flow cytometry assays. When anti-IgG or anti-IgG4 detection antibodies were used in the tests, it was possible to differentiate infected individuals from non-infected individuals, from both endemic and non-endemic areas for schistosomiasis. However, the test using anti-IgA detection antibody was not able to discriminate between infected and non-infected individuals from endemic area. Among the three tests, the one that evaluated the IgG4 reactivity against recombinant PPE showed better performance, with 90.91% sensitivity, 80% specificity and overall accuracy of 0.90. The results obtained in this study showed that the recombinant PPE is a promising antigen to be used in a serological diagnosis test for schistosomiasis and that the tests developed have the potential to be applied to accurately diagnose the disease.

**Key-words:** Serological diagnosis, schistosomiasis, ELISA, flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de percentual de positividade, por município. Brasil, 2009-2017 .....	17
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	19
<b>Figura 3</b> - Etapas do acoplamento de proteínas a microesferas funcionais .....	46
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da estratégia de análise dos resultados dos ensaios de citometria de fluxo .....	49
<b>Figura 5</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão dos plasmídeos pQE-40 e pET21a-PPE .....	51
<b>Figura 6</b> - Sequência parcial do plasmídeo pET21a-PPE e de aminoácidos da proteína PPE recombinante .....	52
<b>Figura 7</b> - Alinhamento da sequência de aminoácidos da PPE recombinante com a proteína G4V8Y7 .....	53
<b>Figura 8</b> - Alinhamento da sequência de aminoácidos da PPE recombinante com proteínas ortólogas de <i>Schistosomas</i> .....	54
<b>Figura 9</b> - Análise de indução da expressão da proteína PPE recombinante por SDS-PAGE ..	55
<b>Figura 10</b> - Análise das frações insolúvel e solúvel do lisado bacteriano por SDS-PAGE .....	56
<b>Figura 11</b> - Avaliação da purificação da PPE recombinante por SDS-PAGE .....	57
<b>Figura 12</b> - <i>Western blotting</i> com a proteína PPE recombinante purificada e com anticorpo anti- histidina .....	58
<b>Figura 13</b> - <i>Western blotting</i> com a PPE recombinante e amostras de soro humano .....	59
<b>Figura 14</b> - Avaliação da estabilidade da proteína PPE recombinante mantida em diferentes condições .....	60
<b>Figura 15</b> - Avaliação da reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante por SDS-PAGE .....	61
<b>Figura 16</b> - Avaliação da concentração da PPE recombinante no ensaio de ELISA para análise da reatividade de IgG total .....	62
<b>Figura 17</b> - Curvas de titulação dos <i>pools</i> de soro no ensaio de ELISA para análise da reatividade de IgG total contra PPE recombinante .....	63

<b>Figura 18</b> - Curvas de titulação do anticorpo anti-IgG total conjugado a HRP no ensaio de ELISA .....	64
<b>Figura 19</b> - Análise da reatividade de IgG total contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por ELISA .....	66
<b>Figura 20</b> - Curvas ROC dos testes de reatividade de IgG total contra a proteína PPE recombinante nos ensaios de ELISA .....	67
<b>Figura 21</b> - Avaliação da concentração da proteína PPE recombinante e da diluição do anticorpo anti-IgG4 humana nos ensaios de ELISA .....	69
<b>Figura 22</b> - Curvas de titulação dos <i>pools</i> de soro no ensaio de ELISA para análise da reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante .....	70
<b>Figura 23</b> - Análise da reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por ELISA .....	72
<b>Figura 24</b> - Curvas ROC dos testes de reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante nos ensaios de ELISA .....	73
<b>Figura 25</b> - Confirmação do acoplamento da proteína PPE recombinante às microesferas funcionais .....	75
<b>Figura 26</b> - Padronização e análise da reatividade de IgG total contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por citometria de fluxo .....	77
<b>Figura 27</b> - Padronização e análise da reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por citometria de fluxo .....	78
<b>Figura 28</b> - Padronização e análise da reatividade de IgA contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por citometria de fluxo .....	80
<b>Figura 29</b> – Curvas ROC dos testes de reatividade de IgG, IgG4 e IgA contra a proteína PPE recombinante nos ensaios de citometria de fluxo .....	81

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultado do teste de diagnóstico sorológico utilizando a proteína PPE recombinante em ensaios de ELISA para detecção de IgG total específica .....68
- Tabela 2** – Desempenho dos testes de diagnóstico sorológico por ELISA utilizando a proteína PPE recombinante e imunoglobulina IgG .....68
- Tabela 3** – Resultado do teste de diagnóstico sorológico utilizando a proteína PPE recombinante em ensaios de ELISA para detecção da imunoglobulina IgG4 .....73
- Tabela 4** – Desempenho dos testes de diagnóstico sorológico por ELISA utilizando a proteína PPE recombinante e imunoglobulina IgG4 .....74
- Tabela 5** – Resultado do teste de diagnóstico sorológico utilizando a proteína PPE recombinante em ensaios de citometria de fluxo para detecção das diferentes imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA .....82
- Tabela 6** – Desempenho dos testes de diagnóstico sorológico por citometria de fluxo utilizando a proteína PPE recombinante e imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA .....82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**Anti-his:** Anticorpo monoclonal anti-histidina

**AUC:** Área sob a curva, do inglês: *Area Under Curve*

**BCA:** *Bicinchoninic Acid Protein Assay*

**BLASTp:** *Protein Basic Local Alignment Search Tool*

**BSA:** Albumina sérica bovina

**CAA:** Antígeno Anódico Circulante

**CBA:** *Cytometric bead array*

**CCA:** Antígeno Catódico Circulante

**CDS:** *Coding sequence*

**Curva ROC:** *Receiver-Operating Characteristic curve*

**DALYs:** *Disability-adjusted Life Years*

**DTT:** Ditioneitról

**ELISA:** *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**FL2:** Fluorescência do tipo 2

**FSC:** *Forward Scatter*

**FT:** *Flow-Through*

**HD:** Indivíduos saudáveis de área não endêmica, do inglês: *Health Donors*

**HPJ:** Hoffman, Pons e Janer

**HRP:** *horseradish peroxidase*

**IC:** Intervalo de confiança

**IFI:** Imunofluorescência indireta

**INF:** Indivíduos infectados pelo *S. mansoni*

**IPTG:** *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

**IRR:** Instituto René Rachou

**LAMP:** *Loop-mediated isothermal amplification*

**LB:** Lúria Bertani

**MEA:** *Major EGG Antigen*

**MFI:** Intensidade Média de Fluorescência, do inglês: *Median Fluorescence Intensity*

**NE:** Indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose

**NEM:** *N-Ethylmaleimide*

**OD<sub>600</sub>:** Densidade óptica a 600 nm

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**Pb:** Pares de base

**PBS:** Tampão salina-fosfato

**PBS-T:** Tampão PBS-Tween 20 0,05%

**PCE:** Programa de Controle da Esquistossomose

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PM:** Peso molecular

**POC:** *Point of care*

**POC-CCA:** *Point-of-care circulating cathodic antigen*

**POS Alto:** *Pool* de amostras de soro de indivíduos infectados que apresentaram alta reatividade contra antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni*

**POS Baixo:** *Pool* de amostras de soro de indivíduos infectados que apresentaram baixa reatividade contra antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni*

**PPE:** Principal Proteína do Ovo (*Egg*)

**PZQ:** Praziquantel

**RT-qPCR:** PCR quantitativa em Tempo Real

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, do inglês: *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

**SFB:** Soro Fetal Bovino inativado

**SisGen:** Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

**SSC:** *Side Scatter*

**ST:** Extrato solúvel total

**Sulfo-SMCC:** *Sulfosuccinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyclohexane 1-carboxylate*

**SWAP:** *Solube worm adult protein*

**TBS-T:** Tris-salina contendo Tween 20

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**UV:** Luz ultravioleta

**VDG:** Virgem das Graças

**VPN:** Valor preditivo negativo

**VPP:** Valor preditivo positivo

**WHO:** Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 Aspectos gerais da esquistossomose.....	16
1.2 Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	18
1.3 Imunopatologia da esquistossomose mansoni.....	20
1.4 Estratégias de controle e prevenção da esquistossomose .....	21
1.5 Diagnóstico da esquistossomose .....	23
1.5.1 Métodos parasitológicos .....	23
1.5.2 Métodos moleculares .....	25
1.5.3 Métodos imunológicos .....	27
1.6 A proteômica como ferramenta de prospecção de antígenos potenciais para o diagnóstico da esquistossomose.....	31
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 Amostras de soro humano .....	36
4.2 Anticorpos comerciais .....	37
4.3 Obtenção da sequência de DNA codificadora da proteína PPE de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	37
4.4 Análises de sequência.....	38
4.5 Transformação bacteriana.....	39
4.6 Indução da expressão da proteína PPE recombinante em sistema procarioto .....	40
4.7 Purificação da proteína PPE recombinante .....	41
4.8 Diálise da proteína PPE recombinante .....	42
4.9 Dosagem de proteína .....	42
4.10 <i>Western blotting</i> com anticorpo monoclonal anti-histidina.....	43
4.11 <i>Western blotting</i> com soro humano .....	43
4.12 Estabilidade e reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante .....	44
4.13 Ensaio de ELISA.....	44
4.14 Ensaio de citometria de fluxo com microesferas funcionais.....	46
4.14.1 Confirmação do acoplamento com anticorpo monoclonal anti-histidina.....	46
4.14.2 Ensaio de citometria de fluxo com soro humano.....	47
4.15 Estratégia de análise dos resultados dos ensaios de citometria de fluxo .....	48
4.16 Análises estatísticas .....	49
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>



5.1	Análise do plasmídeo pET21a-PPE por digestão com enzimas de restrição .....	51
5.2	Análise da sequência da proteína PPE recombinante .....	52
5.3	Indução da expressão da proteína PPE de <i>Schistosoma mansoni</i> em sistema procarioto..	54
5.4	Avaliação da expressão da PPE recombinante nas frações de proteínas solúveis e insolúveis do lisado bacteriano.....	55
5.5	Purificação da proteína PPE recombinante .....	56
5.6	Deteção da proteína PPE recombinante por <i>western blotting</i> com anticorpo anti-histidina.....	58
5.7	Avaliação da imunorreatividade da PPE recombinante contra diferentes amostras de soro humano por <i>western blotting</i> .....	59
5.8	Avaliação da estabilidade da PPE recombinante.....	60
5.9	Avaliação da reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante.....	60
5.10	Avaliação da reatividade de IgG e IgG4 contra a PPE recombinante em ensaios de ELISA.....	61
5.11	Confirmação da estratégia de acoplamento da PPE recombinante a microesferas funcionais .....	74
5.12	Ensaio de citometria de fluxo com soro humano.....	76
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXO I - Lista de anticorpos comerciais.....</b>	<b>109</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada que acomete mais de 200 milhões de pessoas no mundo e 779 milhões de indivíduos vivem sob o risco de infecção em 78 países da África, América do Sul, América Central e Ásia (STEINMANN et al., 2006; WHO, 2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose ainda é considerada um problema de saúde pública em várias partes do mundo. A doença é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, em comunidades carentes de água potável e sem saneamento básico (WHO, 2020).

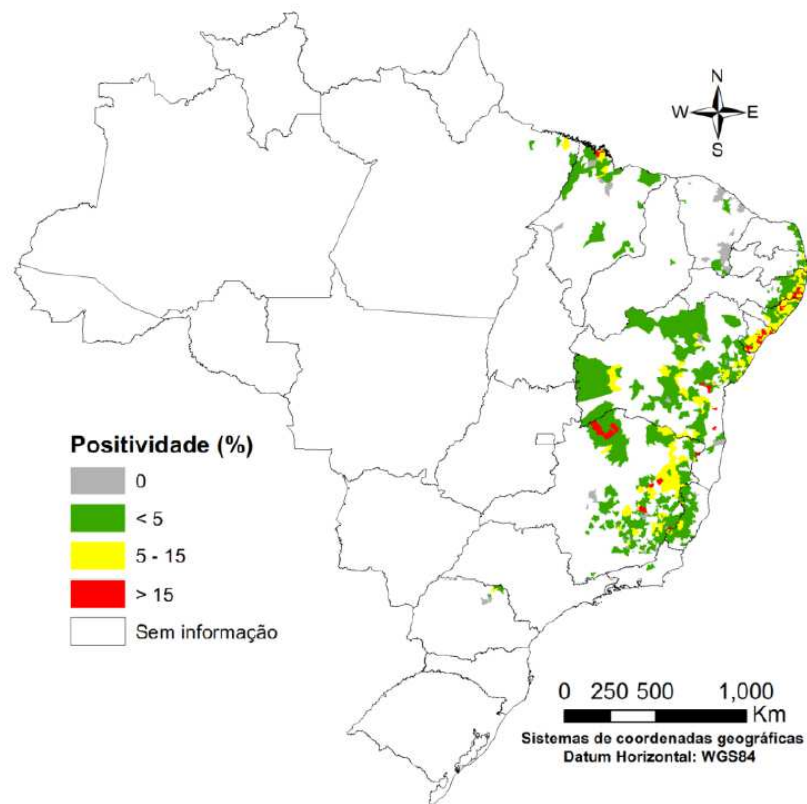
De acordo com um estudo do *Global Burden of Disease* do ano de 2016, foi estimada uma perda de 1,9 milhões de DALYs (*Disability-adjusted Life Years*) pela esquistossomose no mundo. Esse indicador mede os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade ou os anos de vida potencialmente perdidos por morte prematura devido à doença. Entretanto, em comparação com estudos realizados anteriormente, este dado pode estar subestimado por não ter incluído a desnutrição, a anemia e a oscilação no crescimento de crianças, que são manifestações relacionadas à esquistossomose, mas que geralmente não são atribuídas a ela (KING et al, 2005).

O agente causador da esquistossomose são helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, descrito pela primeira vez em 1852 por Theodor Bilharz. Existem seis espécies que infectam o homem, sendo três delas de maior importância epidemiológica: *Schistosoma japonicum*, descrito por Katsurada (1904), *Schistosoma haematobium*, por Theodor Bilharz (1852) e *Schistosoma mansoni*, descrito por Sambon (1907) e por Pirajá da Silva (1908).

No Brasil, a doença é causada pela espécie *S. mansoni* e está diretamente associada à presença de moluscos transmissores das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. Até 2008, em 24 dos 26 estados brasileiros, além do Distrito Federal, havia sido notificada a presença de pelo menos uma das três espécies vetoras do *S. mansoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). Atualmente, a parasitose ocorre em todas as regiões do país, contabilizando 19 estados, sendo as regiões nordeste e sudeste as mais afetadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2014) (Figura 1). Entre os anos de 2010 e 2015 foi realizado no Brasil um Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses. Participaram deste inquérito 521 municípios e foram analisados 197.564 escolares na faixa de 7 a 17 anos. O inquérito foi realizado utilizando o método de diagnóstico

parasitológico de Kato-Katz (KATZ et al., 1972), com duas lâminas de uma única amostra de fezes. A prevalência estimada para esquistossomose no Brasil foi de 1%, sendo o Nordeste e o Sudeste as macrorregiões que apresentaram as maiores taxas de positividade (KATZ, 2018). No entanto, o valor de prevalência encontrado pode ter sido subestimado, uma vez que o método de diagnóstico empregado neste inquérito apresenta falhas na detecção da doença em áreas com infecções de baixa carga parasitária (ENK et al., 2008a; SIQUEIRA et al., 2011).

**Figura 1 – Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de percentual de positividade, por município. Brasil, 2009-2017.**



Fonte: Ministério da Saúde do Brasil, 2020.

Nos indivíduos acometidos pela esquistossomose, a doença apresenta sintomas inespecíficos como fraqueza, dor abdominal e diarreia, sintomatologia comum a outros tipos de infecções. Apesar da esquistossomose ser uma doença de baixa letalidade, ela apresenta impactos significativos na qualidade e na expectativa de anos de vida saudáveis dos indivíduos acometidos, tanto na infância quanto na idade adulta. Reinfecções e infecções crônicas estão relacionadas com a presença de desnutrição, anemia, diarreia, fadiga, e prejuízos cognitivos, principalmente em crianças acometidas na idade escolar (KING et al., 2005). Em alguns casos,

a doença pode evoluir para formas clínicas mais graves, que são denominadas como hepatointestinais ou hepatoesplênicas (PRATA & BINA, 1968). Entretanto, devido à existência dos programas de controle para a esquistossomose, estas formas estão cada vez mais raras no Brasil (COURA & AMARAL, 2004).

## 1.2 Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* é caracterizado como um ciclo complexo que envolve duas fases, sendo uma no hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e outra no hospedeiro definitivo, dentre os quais o homem representa o hospedeiro mais importante do ponto de vista epidemiológico (Figura 2).

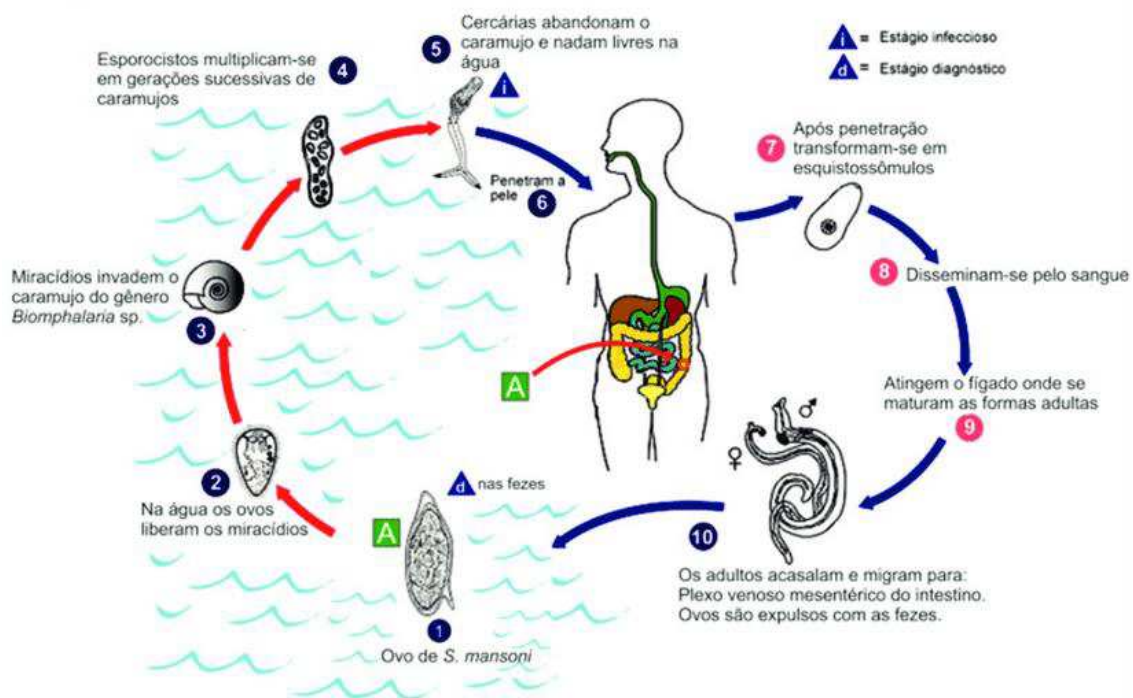
Os ovos do parasito são liberados juntamente com as fezes do hospedeiro infectado e, quando entram em contato com a água, as larvas ciliadas, chamadas de miracídios, eclodem dos ovos. Por serem livres em meio aquático, os miracídios encontram o seu hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Ao penetrarem nas partes moles do molusco, com o auxílio de secreções glandulares, ocorre a perda do epitélio ciliar e os miracídios se desenvolvem para a forma de esporocisto primário. Após 14 dias, ocorre a formação dos esporocistos secundários. Esses esporocistos sofrem modificações anatômicas, dando início à proliferação das células germinativas e à formação das cercárias. Todo este processo leva em média 30 dias após a penetração dos miracídios (PAN, 1965).

Milhares de cercárias são produzidas por um único esporocisto no hospedeiro intermediário, que as liberam de forma intermitente em meio aquático. As cercárias são a forma infectante do hospedeiro definitivo. A infecção do hospedeiro definitivo pelas cercárias se dá durante o contato do hospedeiro com a água contaminada. As cercárias penetram na pele ou mucosas do hospedeiro definitivo pela ação lítica de secreções glandulares e pela ação mecânica, proveniente dos movimentos intensos da larva. Em alguns indivíduos pode ocorrer uma dermatite alérgica no local, denominada de dermatite cercariana. O processo de penetração das cercárias na pele do hospedeiro resulta em perda de sua cauda, se transformando em esquistossômulos (STIREWALT, 1974; HAAS et al., 1997; WILSON & COULSON, 2009).

Os esquistossômulos entram na circulação sanguínea venosa e são transportados para os pulmões e posteriormente para o fígado, chegando até as veias do sistema porta-hepático, onde irão se desenvolver até a fase de vermes adultos (MILLEER & WILSON, 1980). Após 30 dias da infecção os vermes adultos encontram-se maduros para o acasalamento. Eles então se movem contra a corrente circulatória do sistema porta-hepático e migram para as veias

mesentéricas pélvicas. O casal de vermes permanece constantemente associado, onde a fêmea se localiza no canal ginecóforo do macho. Após 30-40 dias da infecção, inicia-se a produção dos ovos que são eliminados para o ambiente pelas fezes dos indivíduos infectados ou permanecem retidos na parede intestinal. Além disso, os ovos podem também ser levados a órgãos e tecidos do hospedeiro pela circulação sanguínea (BLOCH, 1980). A presença de ovos nos tecidos leva a formação de granulomas, que é o resultado da resposta imune do hospedeiro, sendo o fígado o órgão mais acometido pelos granulomas (LENZI, 1998; CHEEVER & ANDRADE, 1967). Esta resposta de hipersensibilidade limita a liberação de antígenos produzidos pelos ovos, mas também causa danos ao tecido, sendo responsável por muitas das manifestações clínicas associadas com a doença. Os ovos eliminados pelas fezes do hospedeiro irão liberar os miracídeos se encontrarem condições adequadas, tais como: água limpa com temperatura morna, baixa hipotonicidade e iluminação adequada. Os miracídeos, por sua vez, infectarão os moluscos presentes no ambiente, fechando o ciclo de vida do parasito (ROLLINSON & SIMPSON, 1987).

**Figura 2 – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.**



Representação esquemática do ciclo de vida do parasito, demonstrando a fase reprodutiva assexuada no hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e a fase reprodutiva sexuada no hospedeiro humano. Fonte: adaptado de CDC: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>.

### 1.3 Imunopatologia da esquistossomose mansoni

A infecção pelo *S. mansoni* pode desencadear diversas manifestações clínicas no hospedeiro definitivo, e varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito, com a carga parasitária e com a resposta imunológica do indivíduo. Durante o curso da infecção, a esquistossomose pode se apresentar de forma aguda ou crônica, sendo diferenciadas de acordo com as manifestações clínicas e imunológicas (BARSOUM et al., 2013; COLLEY & SECOR, 2014).

A fase aguda é caracterizada pelo estágio inicial da doença, determinada pela penetração das cercárias, migração de esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro definitivo, seguida pelo início da oviposição. A resposta imune é inicialmente inata durante a fase de invasão, seguida por uma resposta imune adaptativa (BURKE et al., 2009).

Os sinais e sintomas apresentados durante a fase aguda estão associados à carga parasitária e ao desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada, podendo ser inespecíficos, (mal-estar, febre, cefaleia, perda de peso, anorexia, artralgia, mialgia e edema), respiratórios (tosse, dispneia, dor torácica e alterações das provas de função pulmonar e da radiografia do tórax), digestivos (dor abdominal, diarreia, hepatoesplenomegalia e elevação das enzimas hepáticas), neurológicos (encefalite e mielite), além de eosinofilia acentuada e leucocitose (LAMBERTUCCI, 2010). Os quadros agudos também podem ser assintomáticos, e paradoxalmente, desencadear um quadro invasivo com distribuição sistêmica de ovos.

A fase crônica se instala aproximadamente após quatro meses (RABELLO, 1995). Nesta fase podem surgir distintas manifestações clínicas, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. A forma crônica habitual ou leve é a forma em que se encontra a maioria das pessoas infectadas em áreas endêmicas, ou eventualmente fora delas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas, assintomáticas. A forma crônica leve geralmente é caracterizada pela baixa carga parasitária dos indivíduos e por uma reação inflamatória granulomatosa de menor intensidade no fígado e intestino. Os sintomas mais comuns são fraqueza, fadiga, dor abdominal e diarreia (CHEEVER & ANDRADE, 1967; CALDAS et al., 2008).

Uma pequena porcentagem de infectados evolui para as formas crônicas mais graves hepatointestinal e hepatoesplênica, caracterizadas morfológicamente por fibrose hepática periportal, denominada pipestem, descrita por Symmers (1904). Esta lesão é representada por uma expansão fibrosa sistêmica dos espaços porta, acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático, circulação venosa colateral e varizes gastrointestinais podendo levar a morte (CALDAS et al., 2008; CARVALHO; COELHO;

LENZI, 2008). Durante a fase crônica, que pode perdurar por toda a vida do hospedeiro, as fêmeas continuam produzindo e liberando ovos (aproximadamente 300 ovos/dia), mas os granulomas são menores do que no período inicial da infecção (PEARCE & MACDONALD, 2002).

O papel biológico das imunoglobulinas na esquistossomose é bastante complexo e continua sendo estudado. Há evidências de que as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade do indivíduo, o estado nutricional, a intensidade e tempo de infecção, bem como com a presença de reinfeções (OLIVEIRA et al., 2004). No início da infecção pelo *S. mansoni* ocorre a ativação do sistema complemento, inicialmente pela via alternativa, e a produção de imunoglobulinas específicas das classes IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA. Na fase crônica são descritos altos títulos de IgG1, IgE e IgG4 (PEARCE & MACDONALD, 2002; CALDAS et al., 2008). A citocina IL-4, secretada pelas células Th2, induz as células B a secretarem IgG1 e IgE. Já os altos níveis de IgG1 podem estar relacionados com a síntese de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (SILVA et al., 2004). A produção dos anticorpos IgE e IgG4 depende, inicialmente, de IL-4 ou IL-13 produzidos por células do tipo Th2. Além disso, essas imunoglobulinas estão relacionadas, respectivamente, a resistência e susceptibilidade de indivíduos em áreas endêmicas, onde as reinfeções são constantes (CALDAS et al., 2008).

#### **1.4 Estratégias de controle e prevenção da esquistossomose**

As medidas de controle e prevenção da esquistossomose se baseiam em um conjunto de estratégias que incluem o uso de quimioterápicos e moluscidas, juntamente com educação e promoção à saúde, implementação de saneamento ambiental e busca ativa de casos por meio de inquéritos coproscópicos (SARVEL et al., 2011; ROLLINSON et al., 2013).

O tratamento da esquistossomose é realizado exclusivamente com o fármaco Praziquantel (PZQ), que possui um baixo custo e é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*. Entretanto, não foram observados efeitos nas formas mais jovens do parasito, tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro* (PICA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004). Com isso, ao se tornarem vermes adultos, os parasitos que foram refratários ao tratamento com o PZQ continuam mantendo a infecção, contribuindo para a propagação da doença. Além disso, há relatos da existência de linhagens de *S. mansoni* resistentes ao PZQ, principalmente em áreas de alta endemicidade (CRELLEN et al., 2016; DOENHOFF et al., 2008). Por isso, o uso de

medidas profiláticas baseadas em quimioterapia para controlar a doença é uma grande preocupação da OMS (McMANUS et al., 2018;).

Vários estudos epidemiológicos demonstraram que o tratamento em massa da população com PZQ resultou na redução significativa da morbidade da doença, apesar de não promover a sua eliminação (McMANUS et al., 2018). No entanto, a quantidade de medicamento disponível é limitada no continente africano, e muitas pessoas não têm acesso ao tratamento. Além disso, em alguns países onde a prevalência da doença é alta, existe uma baixa adesão da população ao tratamento (ADRIKO et al., 2018). Nessas áreas, os indivíduos infectados e não tratados contribuem para a manutenção da doença, que se mantém presente em toda a população. Dados reportados em 2018 mostraram que dos 229,2 milhões de pessoas no mundo que necessitavam de tratamento preventivo, apenas 95 milhões receberam este tratamento. Isso equivale a uma cobertura de 61% de crianças em idade escolar e de apenas 18% de adultos (WHO, 2020).

Outra medida de controle da doença são os programas de erradicação de moluscos, que são pouco eficazes devido à sua resistência aos moluscidas e ainda porque prejudicam a fauna e a flora aquáticas do ambiente (COELHO & CALDEIRA, 2016).

Em 2012 a OMS estabeleceu como metas o controle da doença e a eliminação da esquistossomose como um problema de saúde pública, a serem alcançadas até 2020 e 2025, respectivamente (McMANUS, 2019). Para atingir essas metas, a OMS recomendou diretrizes de tratamento baseadas na prevalência de infecções de alta intensidade em crianças em idade escolar (5 a 14 anos). Apesar das diretrizes atuais se concentrarem nas crianças, por apresentarem risco mais alto de infecção, o tratamento em adultos considerados em risco também é recomendado nas áreas de maior prevalência, devido à morbidade causada pela doença (TOOR et al., 2020; LI, 2019).

No Brasil, têm sido feitos esforços para o controle e eliminação da doença desde 1980, com a implementação do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) pelo Ministério da Saúde. O programa visa a realização de inquéritos coproscópicos censitários, tratamento de indivíduos infectados, medidas de saneamento ambiental, educação em saúde e vigilância epidemiológica (COSTA et al., 2017).

Contudo, apesar da implementação de programas e estratégias de ações de controle da esquistossomose no mundo, ainda existem alguns fatores que contribuem para a manutenção da doença, como o baixo poder socioeconômico da população afetada, a falta de saneamento básico e a ausência de métodos de diagnóstico que sejam capazes de detectar infecções com baixa carga parasitária (PATZ et al., 2000; ENK et al., 2010; ROLLINSON et al., 2013).



O cenário epidemiológico atual demonstra que a prevalência da esquistossomose vem sendo subestimada nos últimos anos. O método de diagnóstico parasitológico usual (Kato-Katz) é conhecido por ser altamente específico, mas cada vez menos sensível à medida que a prevalência diminui, ou em áreas com baixa prevalência de infecção (COLLEY et al., 2017).

### **1.5 Diagnóstico da esquistossomose**

O diagnóstico diferencial da esquistossomose deve ser feito por meio de exames laboratoriais, uma vez que a doença apresenta sintomas semelhantes a outras doenças. Existe uma grande variedade de métodos de diagnóstico para a esquistossomose. Entretanto, cada um possui suas vantagens e limitações. Eles se dividem em métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos se baseiam na detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes ou tecidos do indivíduo infectado, na detecção de material genético do parasito ou na presença de antígenos circulantes do parasito (WEERAKOON et al., 2015). Os métodos indiretos se baseiam em técnicas imunológicas que envolvem a detecção de marcadores bioquímicos e reações de antígeno-anticorpo. Esses métodos possuem aplicação principalmente em inquéritos epidemiológicos, acompanhados ou não de exames de fezes (OGONGO et al., 2018; McMANUS et al., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2014). Os métodos de diagnóstico também podem ser classificados em qualitativos e quantitativos, uma vez que estes últimos podem estimar a carga parasitária de um indivíduo, o que possibilita o estabelecimento de indicadores epidemiológicos para os programas de controle da doença (CARVALHO et al., 2008).

#### **1.5.1 Métodos parasitológicos**

Os métodos parasitológicos apresentam uma boa relação de custo-benefício e podem ser facilmente executados em locais com infraestrutura laboratorial precária (CAVALCANTI et al., 2013). Em áreas onde a infecção se apresenta com níveis altos de carga parasitária, um teste com sensibilidade moderada é aceitável (MCCARTHY et al., 2012). Contudo, os testes também devem apresentar desempenho suficiente para detectar alterações na prevalência e na intensidade de infecção (SOLOMON et al., 2012), e isso demanda uma abordagem diagnóstica mais sensível e robusta, com um aumento do tamanho da amostragem e/ou do número de lâminas e amostras analisadas (ENK et al., 2008).

Na literatura estão descritas diversas técnicas parasitológicas que se encontram em desuso por não proporcionarem aplicação prática no diagnóstico da doença, como a técnica do Formol-éter (KNIGHT et al., 1976), técnica de flutuação (WILLIS, 1921), técnica de

centrifugação em éter sulfúrico (BLAGG et al., 1955), técnica de eclosão de miracídios (ZICKER et al., 1977; JURBERG et al., 2008), método de Bell (1963), o método de Barbosa (1965), além de métodos que se baseiam no uso de lâminas sem nenhuma padronização técnica (MARTINS, 1937).

Uma das técnicas parasitológicas ainda utilizadas é a de sedimentação espontânea, descrita por Lutz, em 1919, conhecida como método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) (1934). Esta técnica se baseia na observação de ovos nas fezes, que são homogeneizadas em água, e posteriormente filtradas em telas de metal para a retenção dos resíduos fecais de maior dimensão. A solução filtrada é mantida em repouso, e a parte sedimentada é transferida para uma lâmina sob uma lamínula, que é examinada em microscópio óptico. Essa técnica é muito utilizada em laboratórios de análises clínicas e em inquéritos coproparasitológicos por possibilitar o diagnóstico simultâneo de outras parasitoses (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2014; CARVALHO et al., 2008).

Outro teste parasitológico amplamente utilizado há décadas é o de Kato-Katz. Este é recomendado internacionalmente pela OMS para o diagnóstico da esquistossomose intestinal e determinação da intensidade de infecção (WEERAKOON et al., 2015). Essa técnica foi descrita primeiramente por Kato & Miura, em 1954, e adaptada posteriormente por Katz e colaboradores (1972), simplificando a técnica. É um método de fácil execução que detecta ovos do parasito *S. mansoni* e de outros geo-helminthos nas fezes do hospedeiro infectado. A técnica consiste na obtenção de aproximadamente 45mg de fezes, previamente passadas por uma malha de 200 micra. A amostra é comprimida em um orifício de 6mm de diâmetro e então, é espalhada sobre uma lâmina de celofane embebida em uma solução de verde malaquita. As lâminas são visualizadas em microscópio óptico, e podem ser transportadas e armazenadas em temperatura ambiente por meses, sem perda dos resultados. É uma técnica altamente específica e possui um baixo custo operacional. Porém a sua sensibilidade varia de acordo com a carga parasitária, com o número de amostras coletadas, com o número de lâminas analisadas e, principalmente, com o nível de endemidade da área afetada (RABELLO, 1997; ZHANG et al., 2009). Outra limitação desse método é a consistência das fezes a serem analisadas. Amostras diarreicas impossibilitam a execução da técnica, prejudicando a quantificação de ovos nas fezes analisadas (BELL, 1963; BOUT et al., 1975).

Apesar de todas as vantagens que a técnica de Kato-Katz apresenta, a utilização do teste tem sido severamente criticada. Quando empregado em áreas de alta prevalência, apresenta altos níveis de sensibilidade. Entretanto, existem inúmeras evidências de que a sensibilidade do

teste é altamente comprometida quando aplicado em áreas com infecções de baixa intensidade (SIQUEIRA et al., 2011; ENK et al., 2008b).

Outro método parasitológico empregado no diagnóstico da esquistossomose é o método de gradiente salínico que se baseia na sedimentação diferencial de 500mg de fezes quando submetidas a um fluxo lento e contínuo de solução salina. Este método demonstrou maior sensibilidade quando aplicado em trabalhos de campo, em comparação à técnica de Kato-Katz (COELHO et al., 2009).

O Helmintex® é um teste que proporcionou um avanço considerável entre as técnicas parasitológicas já existentes. Desenvolvido por Teixeira e colaboradores (2007), se baseia no processamento de 30g de fezes em uma sequência de passos de concentração, que finaliza com o isolamento dos ovos por interação com esferas paramagnéticas, dentro de um campo magnético. Alguns trabalhos demonstram que o Helmintex® possui uma maior sensibilidade quando comparado à técnica de Kato-Katz (CALDEIRA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2012), atingindo 100% de sensibilidade no limite de 1,3 ovos por grama de fezes (TEIXEIRA et al., 2007). Um estudo comparativo entre os métodos de Kato-Katz, Helmintex e POC-CCA confirmou a alta sensibilidade do Helmintex e sugere sua utilização como teste de referência no diagnóstico da esquistossomose e para avaliação comparativa de outros testes (LINDHOLZ et al., 2018). Apesar da alta sensibilidade deste método, o Helmintex não é adequado para atividades de campo e deve ser executado em laboratórios equipados. A execução do método requer várias etapas de processamento e gera um volume considerável de material a ser analisado, o que demanda um longo tempo para leitura do resultado, além da necessidade de pessoal capacitado para fazer essas leituras. Desta forma, o método não é indicado para ser utilizado em estudos de campo em larga escala (FAVERO et al., 2017).

Um outro método parasitológico é a realização de biópsia da mucosa retal para a verificação da presença de ovos (OTTOLINA & ATÊNCIO, 1943). Trata-se de um procedimento altamente invasivo, sendo utilizados apenas em casos específicos para avaliação individual de pacientes (CARVALHO et al., 2008).

### **1.5.2 Métodos moleculares**

Entre os métodos de diagnóstico molecular existentes para a esquistossomose, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade, principalmente em infecções com baixa carga parasitária. A PCR se baseia em ciclos de amplificação de material genético de *S. mansoni* (DNA ou RNA) presente nas fezes e

em outros tipos de amostras, como soro e urina, gerando milhões de cópias desse material de maneira altamente específica. Esse método demonstrou ser dez vezes mais sensível que o método parasitológico Kato-Katz (PONTES et al., 2002; PONTES et al., 2003).

A PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) (HIGUCHI et al., 1993) é uma técnica que se baseia na monitoração da reação de amplificação e quantificação de DNA a cada ciclo de amplificação, com a capacidade de detectar e mensurar quantidades mínimas de material genético do parasito nas amostras. Esse método também se destaca por apresentar sensibilidade e especificidade mais altas quando comparada com a PCR convencional. Além disso, mostrou-se eficiente para detecção e diferenciação da infecção pelo *S. mansoni* e *S. haematobium* em amostras de fezes, urina, soro e de biópsias (GUEGAN et al., 2019).

Uma variação da metodologia de PCR é a técnica de PCR-ELISA, que se baseia na amplificação de DNA do parasito em amostras de fezes, seguida de um ensaio imunoenzimático capaz de quantificar o produto de PCR marcado com biotina (GOMES et al., 2010). A especificidade desse método foi demonstrada pela ausência de amplificação de DNA de outros helmintos, e entre outras vantagens, a PCR-ELISA se caracteriza como um ensaio semi-quantitativo, com potencial para estimar a carga parasitária e ser aplicado em áreas de baixa endemicidade. Esta técnica também pode ser aplicada na avaliação de eficiência de vacinas, drogas e no monitoramento de cura após tratamento. Siqueira e colaboradores (2015) avaliaram o desempenho dos testes parasitológicos de Kato-Katz e TF-Test e do teste molecular de PCR-ELISA para diagnóstico e controle de cura da esquistossomose em uma área de baixa transmissão. O resultado do teste de PCR-ELISA com apenas uma amostra de fezes demonstrou moderada concordância com os testes parasitológicos que foram utilizados como referência, nos quais foram analisadas 18 lâminas de Kato-Katz e o TF-Test. Uma plataforma laboratorial de PCR-ELISA para o diagnóstico molecular de *S. mansoni* foi desenvolvida por Senra e colaboradores (2018) sendo capaz de detectar 3fg de DNA do parasito em um ensaio que permite o processamento de 46 amostras de fezes em duplicata.

Uma outra metodologia molecular existente é o LAMP (*loop-intermediated isothermal amplification*) (NOTOMI et al., 2000) que se baseia na amplificação de DNA em condições isotérmicas. Quando comparada com as outras técnicas moleculares, é considerada mais simples por não necessitar de equipamentos robustos para a sua execução, podendo ser aplicada em estudos de campo, além de apresentar sensibilidade e especificidade mais altas em relação aos métodos parasitológicos (GANDASEGUI et al., 2018). A técnica já foi utilizada com sucesso na detecção de DNA do *S. mansoni* em amostras de urina de humanos (FERNÁNDEZ-

SOTO et al., 2019), bem como na detecção de 1fg de DNA do parasito em amostras de fezes de camundongos (FERNÁNDEZ-SOTO et al., 2014).

Variações das metodologias moleculares foram desenvolvidas e apresentam resultados que sugerem seu uso no diagnóstico da esquistossomose, como o uso da PCR digital (POMARI et al., 2019) e a detecção de miRNAs de *Schistosoma* por RT-qPCR a partir de vesículas extracelulares extraídas do soro de pacientes infectados (MENINGHER et al., 2017).

No entanto, apesar dos métodos de diagnóstico moleculares apresentarem alta sensibilidade e especificidade, eles apresentam algumas limitações como a facilidade de contaminação dos reagentes e a presença de inibidores nas amostras de soro, urina ou fezes que impedem a amplificação de material genético, podendo gerar resultados falso-negativos (CARNEIRO et al., 2013; VERWEIJ & STENSVOLD, 2014; WICHMANN et al., 2009). Os testes moleculares também dependem da presença do material genético do parasito na amostra para ser amplificado. Além disso, possuem um alto custo devido aos reagentes e equipamentos utilizados e uma alta complexidade quanto ao manuseio dos mesmos, o que dificulta a implementação desses testes em áreas endêmicas, sendo viáveis apenas para grandes laboratórios de análises clínicas ou de pesquisa (UTZINGUER et al., 2015).

### **1.5.3 Métodos imunológicos**

Os métodos imunológicos baseiam-se na detecção de anticorpos do hospedeiro desenvolvidos contra antígenos do parasito, ou na detecção direta de antígenos do parasito. Existe uma ampla variedade de testes imunológicos para esquistossomose descritos na literatura. Entretanto, alguns se encontram em desuso devido ao avanço das outras metodologias. A maioria dos métodos disponíveis é direcionada à detecção de anticorpos desenvolvidos contra o parasito, podendo apresentar níveis significativos de sensibilidade e especificidade. Existem estudos que utilizaram antígenos capazes inclusive de diferenciar infecções ativas de exposições prévias, que representa uma das limitações dos ensaios sorológicos, demonstrando que os mesmos podem ser empregados em testes que apresentam bom desempenho (JIN et al., 2010; CARVALHO et al., 2017). Devido ao potencial de serem mais sensíveis, as técnicas imunológicas são as mais adequadas para serem utilizadas como métodos auxiliares em levantamentos epidemiológicos e controle de cura em áreas de baixa endemicidade, onde os métodos parasitológicos falham em detectar a infecção (HINZ et al., 2017).

Entre os métodos imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose descritos na literatura, podem ser citados: a reação intradérmica, que consiste na reação de hipersensibilidade imediata do tipo I, ou anafilática, contra antígenos do parasito, que se torna positiva entre 30-60 dias após a infecção. A técnica utiliza antígenos brutos de diferentes estágios do ciclo de vida do parasito. Porém oferece baixa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da doença (REY, 2001; BERGQUIST, 1992). Assim como a reação intradérmica, outras técnicas sorológicas estão em desuso, como: reação pericercariana (VOGEL & RUNNING, 1949), reação de aglutinação cercariana (LIU & BANG, 1950), reação de imobilização de miracídio (SENTERFIT, 1953), reação de hemaglutinação indireta (KAGAN, 1955), reação de fixação do complemento (MINNING, 1941), reação periovular (OLIVER-GONZALES, 1954) e o teste de radioimunoensaio (STEK et al., 1985).

Das metodologias utilizadas atualmente, podemos destacar a imunofluorescência indireta (IFI), descrita em 1960 por SADUN e colaboradores. Este método se baseia no princípio da ligação de anticorpos a antígenos presentes na superfície de formas evolutivas do parasita e na ligação secundária de anticorpos marcados com um fluorocromo, sendo o resultado obtido pela visualização em microscópio óptico de fluorescência. Em um estudo realizado em uma área de baixa endemicidade do Brasil, utilizando a técnica de Kato-Katz foi observada uma prevalência de 1,6%, enquanto nos testes de imunofluorescência utilizando cortes de vermes adultos de *S. mansoni* e as imunoglobulinas IgG e IgM, os índices de positividade foram de 33.2% e 33.5%, respectivamente, demonstrando uma maior sensibilidade da técnica de imunofluorescência (BURLANDY-SOARES et al., 2003).

Uma das técnicas sorológicas mais utilizadas no diagnóstico da esquistossomose é o ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), que consiste tanto na detecção de antígenos do parasito (ELISA direto), quanto na detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro infectado (ELISA indireto). A metodologia indireta é a mais utilizada para detecção de diferentes classes de anticorpos produzidos durante a infecção. O princípio do ensaio se baseia na incubação do antígeno com amostras de soro, seguida da incubação com um anticorpo secundário conjugado a uma enzima que irá promover a revelação do teste.

Os antígenos utilizados nos ensaios de ELISA podem ser obtidos das diferentes formas evolutivas do ciclo de vida do parasito presentes no hospedeiro definitivo, sendo constituídos de proteínas e/ou polissacarídeos. Os mais utilizados são extratos brutos do parasito conhecidos como antígeno solúvel de vermes adultos de *S. mansoni* (SWAP – *soluble worm adult protein*) e extratos do ovo, conhecido como antígeno solúvel de ovo (SEA – *soluble egg antigen*). Esses

antígenos são caracterizados como altamente antigênicos, porém podem apresentar reação cruzada com antígenos de outros parasitos (DOENHOFF et al., 2004).

Diversos estudos utilizaram proteínas recombinantes como antígenos para o imunodiagnóstico da esquistossomose e demonstraram resultados promissores em ensaios de ELISA. No trabalho de Carvalho e colaboradores (2014), a proteína recombinante rSm200 apresentou taxas de sensibilidade de 90% e especificidade de 93,3%, sendo capaz de diferenciar indivíduos saudáveis de área não endêmica de indivíduos infectados de área endêmica, além de demonstrar uma correlação positiva com a carga parasitária. Uma proteína recombinante com alta expressão em ovos do parasito *S. manoni*, denominada *Major Egg Antigen*, também apresentou bom desempenho em um ensaio de ELISA, com sensibilidade de 87% e especificidade de 89%. Entretanto, 50% das amostras de soro de indivíduos não infectados de área endêmica reagiram contra esta proteína (Silva-Moraes et al., 2019).

Resultados promissores foram obtidos por Chen e colaboradores (2013). O uso das proteínas SjE16, SjPPlase e SjRobl, que são proteínas expressas em ovos de *S. japonicum*, na forma recombinante em ensaios de ELISA, resultou em taxas de sensibilidade de 40%, 80% e 70%, respectivamente. Os trabalhos de Xu e colaboradores (2014) apresentaram resultados ainda melhores em ensaios de ELISA utilizando a proteína recombinante SjSP-13 de *S. japonicum* como antígeno, com sensibilidade de 90,4% e especificidade de 98,9%.

Peptídeos sintéticos também já foram testados em ensaios de ELISA para o diagnóstico de infecção pelo *S. mansoni*. Utilizando análises de bioinformática, Carvalho e colaboradores (2017) selecionaram sete peptídeos para serem testados em um imunodiagnóstico por ELISA. Destes, cinco peptídeos alcançaram bom desempenho, inclusive sendo capazes de discriminar indivíduos infectados de não infectados de área endêmica. Além disso, um peptídeo apresentou potencial de ser utilizado com marcador de infecção ativa. Em um outro estudo, um *pool* de cinco peptídeos foi utilizado como antígeno em um ensaio de ELISA que apresentou sensibilidade de 86,8% e especificidade de 94,2% quando testado em um grupo de amostras de indivíduos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* (OLIVEIRA, et al., 2008).

A detecção de antígenos ou metabólitos do parasito presentes no soro ou na urina de indivíduos infectados também tem sido utilizada como ferramenta no diagnóstico da esquistossomose. A presença de antígenos de vermes adultos no soro e na urina de animais infectados com *S. mansoni* foi reportada por Berggren & Weller (1967). Dois principais tipos de antígenos circulantes foram descritos: o Antígeno Anódico Circulante (CAA) e Antígeno Catódico Circulante (CCA) (DEELDER et al., 1976). Estes antígenos são secretados/excretados

por vermes adultos na circulação sanguínea do hospedeiro e são considerados bons marcadores de infecção, pois seus níveis apresentam menor flutuação no soro e na urina do que ovos nas fezes, além de refletirem a carga parasitária do hospedeiro (POLMAN et al., 1998). Alguns trabalhos mostraram que a quantificação de CAA e CCA no soro e na urina de pacientes infectados por meio de ensaios de ELISA pode ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico da esquistossomose (DEELDER et al., 1989; FILLIÉ et al., 1994; DE JONGE et al., 1989).

O desenvolvimento da metodologia baseada no diagnóstico *point of care* (POC) tem sido uma alternativa para o diagnóstico da esquistossomose para aplicação no campo. A técnica consiste em um teste rápido imunocromatográfico que utiliza um anticorpo monoclonal específico para os antígenos CCA ou CAA. O POC-CCA<sup>®</sup> (*point-of-care circulating cathodic antigen*) (Rapid Medical Diagnostics, Pretoria, África do Sul) é um teste imunocromatográfico que utiliza dois anticorpos monoclonais específicos anti-CCA. É uma metodologia que tem sido amplamente utilizada no continente Africano, onde apresenta bons índices de sensibilidade e especificidade, além de ser um teste prático, fácil e que apresenta um bom custo-benefício (COLLEY, et al., 2013).

No entanto, trabalhos recentes tem mostrado uma redução da acurácia do POC-CCA<sup>®</sup> em áreas de baixa endemicidade, onde predominam as infecções com baixa carga parasitária. Além disso, a presença de traço tem sido motivo de dúvida na interpretação do resultado gerado pelo teste (PERALTA & CAVALCANTI, 2018). Entretanto, a utilização de urina concentrada aumentou a acurácia do teste (GRENFELL et al., 2018). Em um estudo realizado no Brasil, o POC-CCA exibiu limitações na detecção de infecções de baixa intensidade. Quando comparado com um teste parasitológico de alta sensibilidade, como o Helmintex, o POC-CCA apresentou também um grande número de resultados falso-positivos (LINDHOLZ et al., 2018).

Com o avanço das abordagens empregadas nos ensaios sorológicos e com a finalidade de aumentar ainda mais a sensibilidade e a especificidade dos testes, uma outra metodologia que está cada vez sendo mais utilizada no diagnóstico de diferentes doenças é a citometria de fluxo (MARTINS-FILHO et al., 1995). Dentro de uma ampla variedade de ensaios que podem ser realizados, a citometria de fluxo dispõe de uma modalidade que são os ensaios do tipo CBA (*Cytometric bead array*), baseados no uso de microesferas de poliestireno fluorescentes acopladas a proteínas de interesse. Essa metodologia consiste na incubação de uma microesfera funcional, ou de um sistema microesfera-proteína, marcada por um fluoróforo, seguida da incubação com as amostras a serem analisadas, juntamente com um anticorpo secundário de detecção conjugado a um fluorocromo diferente do utilizado na microesfera, sendo o resultado



obtido pela intensidade de fluorescência da reação. Existem trabalhos descritos na literatura que utilizam a citometria de fluxo para o diagnóstico de doenças parasitárias, como Doença de Chagas e leishmaniose (TEIXEIRA-CARVALHO, et al., 2015) e malária (AJUA et al., 2012; ROOBSOONG, 2014). Esta metodologia também já foi empregada no diagnóstico da esquistossomose. Diferentes proteínas recombinantes foram utilizadas em um ensaio sorológico multiplex em plataforma Luminex. Um inibidor de serino protease de *S. mansoni* (SERPIN) e a Sm-RP26 mostraram reatividade significativa com amostras de plasma de pacientes infectados quando comparados com o grupo controle, sendo capaz de detectar a infecção com um nível de especificidade de 82% e 90%, e de sensibilidade de 89% e 68%, respectivamente (TANIGAWA et al., 2015).

Trata-se, portanto, de uma metodologia promissora para o desenvolvimento de um teste sorológico para esquistossomose baseada no uso de antígenos recombinantes, podendo ser altamente sensível e específica, e com potencial de ser facilmente incorporada em ensaios multiplex. Entretanto, esta técnica está condicionada a disponibilidade de citômetros específicos e a capacitação técnica para o seu manuseio (BRITO et al., 2016).

Como exposto acima, a detecção de anticorpos específicos contra o parasito durante a infecção ainda apresenta limitações. Para citar algumas, os níveis de anticorpos nem sempre estão relacionados com a intensidade da infecção pelo *S. mansoni* e os anticorpos podem permanecer circulantes por anos após o tratamento, além da possibilidade de apresentarem reações cruzadas com antígenos de outros helmintos. Por isso, ainda há necessidade de desenvolver testes mais sensíveis e específicos que sejam capazes de identificar precisamente infecções com baixa carga parasitária e de diferenciar infecções ativas de prévias. A seleção de antígenos adequados pode contornar os problemas apresentados pelos testes sorológicos. Além disso, a detecção de antígenos proteicos e de peptídeos do próprio parasito possui um grande potencial de ser utilizada no diagnóstico da esquistossomose (GOMES et al., 2014; HINZ et al., 2017; OGONGO et al., 2018).

## **1.6 A proteômica como ferramenta de prospecção de antígenos potenciais para o diagnóstico da esquistossomose**

Diversos estudos que empregam dados do genoma e do proteoma do *S. mansoni* vêm sendo realizados para buscar potenciais candidatos vacinais, alvos para drogas e biomarcadores de infecção (BERRIMAN et al., 2009; PROTASIO et al., 2012; VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2008). Os estudos proteômicos auxiliam no entendimento das informações codificadas nos

genomas dos parasitos e estão inseridos em diversas abordagens, como nos estudos de expressão de proteínas, e de proteoma estrutural e funcional (SELIGER & KELLNER, 2002; GRAVES & HAYSTEAD, 2002). A aplicação de abordagens proteômicas para identificação de alvos da resposta imune do hospedeiro que pudessem ser utilizados para o desenvolvimento de novas vacinas e testes de diagnóstico teve início com os trabalhos de Ashton e colaboradores (2001). As metodologias utilizadas na proteômica envolvem basicamente a separação de proteínas por eletroforese bidimensional ou por cromatografia uni ou multidimensional e a identificação de proteínas por espectrometria de massas. Em 2004 foi publicado o primeiro trabalho da análise diferencial do proteoma de quatro fases do ciclo de vida do parasito *S. mansoni* (CURWEN et al., 2004) e desde então, diversos estudos relacionados a proteômica do parasito vêm sendo publicados. Vários trabalhos se concentraram no estudo de proteínas expostas na interface hospedeiro-parasito, principalmente pela identificação de proteínas do tegumento (BRASCHI & WILSON, 2006; BRASCHI et al., 2006; PEREZ-SANCHEZ et al., 2008; PEREZ-SANCHEZ et al., 2006; VAN BALKOM et al., 2005; CASTRO-BORGES et al., 2011a e CASTRO-BORGES et al., 2011b) e de proteínas secretadas/excretadas pelo parasito (CASS et al., 2007; GUILLOU et al., 2007; HANSELL et al., 2008; KNUDSEN et al., 2005; LIU et al., 2009; PEREZ-SANCHEZ et al., 2006 e WU et al., 2009), uma vez que estas proteínas constituem alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas e de testes de diagnóstico para a esquistossomose.

Um estudo de imunoproteoma do *S. mansoni* foi realizado por Ludolf e colaboradores (2014). Por meio de ensaios de *western blotting* bidimensional, pela primeira vez, foi avaliada a reatividade de anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados e não infectados de uma área endêmica para esquistossomose contra proteínas totais e do tegumento de vermes adultos do parasito. Desta maneira foi identificado um grupo de *spots* proteicos que reagiram fortemente apenas com anticorpos presentes em soros de indivíduos infectados, o que sugere que essas proteínas possam ser utilizadas como biomarcadores para o desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico da esquistossomose.

Do conjunto de proteínas que foram reconhecidas exclusivamente pelo soro de indivíduos infectados, foi selecionada uma proteína que apresenta massa molecular de aproximadamente 40kDa, que no presente trabalho foi denominada de PPE, Principal Proteína do Ovo (*Egg*).

De acordo com os resultados de Nene e colaboradores (1986), um antígeno de 40kDa é a principal proteína expressa em miracídios e ovos do *S. mansoni*. No entanto, ela também está

presente em outras fases do ciclo de vida do parasito, como cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Além disso, soro de coelho imunizado com a proteína recombinante reconheceu uma proteína de massa molecular semelhante em extratos de ovo de *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. bovis*. Cordingley e colaboradores (1983) mostraram que dentre as proteínas obtidas por tradução *in vitro*, a partir de mRNAs poli(A)<sup>+</sup> extraídos de ovos e vermes adultos, uma proteína de 40kDa é mais abundante. Esta proteína foi imunoprecipitada com soro de coelhos imunizados com antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni*, com soro de camundongos infectados e com soro de pacientes infectados. Desta forma, os autores sugeriram que esta proteína seria um antígeno ideal para uso em testes de imunodiagnóstico da esquistossomose.

## 2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma das doenças tropicais mais prevalentes do mundo. Mais de 200 milhões de pessoas, em 78 países, estão infectadas e mais de 700 milhões estão sob o risco de infecção. A persistência da doença, apesar das ações dos programas de controle nas últimas décadas, pode ser em parte devido à falta de ferramentas de diagnóstico preciso para detecção de casos e para triagem em áreas onde a esquistossomose é endêmica. A implementação da quimioterapia e de políticas de saneamento resultaram na diminuição da carga parasitária no hospedeiro, com consequente diminuição da excreção de ovos. Neste novo cenário epidemiológico da doença, os métodos parasitológicos convencionais falham na detecção da infecção pelo *S. mansoni*. Consequentemente, a real prevalência da esquistossomose vem sendo subestimada nos últimos anos. Esta situação tem contribuído para a ineficiência dos programas de controle da doença e para a manutenção da doença, principalmente em áreas endêmicas. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de testes de diagnóstico mais sensíveis e específicos, capazes de detectar infecção ativa em indivíduos moradores de áreas endêmicas para a esquistossomose. Neste contexto, a proteína PPE de *S. mansoni* representa um alvo interessante para ser utilizado como antígeno em testes sorológicos, uma vez que a mesma foi diferencialmente reconhecida pelo soro de indivíduos infectados em relação ao soro de indivíduos não infectados de área endêmica em ensaios de imunoproteômica realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Sendo assim, o presente trabalho visa à obtenção da forma recombinante da proteína PPE e sua utilização em duas plataformas para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, ELISA e citometria de fluxo, com o objetivo de desenvolver testes de diagnóstico mais sensíveis e específicos que possam ser utilizados para estabelecer a real prevalência da doença e direcionar as ações de controle.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da proteína PPE de *S. mansoni* recombinante como antígeno para compor novos testes de imunodiagnóstico da esquistossomose.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter um clone recombinante de bactérias *E. coli* contendo a região codificadora do gene da proteína PPE de *S. mansoni* inserida em um vetor de expressão em sistema procarioto;
2. Expressar a proteína PPE recombinante em sistema procarioto e purificá-la a partir do lisado bacteriano;
3. Avaliar o reconhecimento da PPE recombinante por anticorpos do soro de indivíduos infectados ou não pelo *S. mansoni*;
4. Padronizar e determinar o desempenho de um teste de diagnóstico da esquistossomose por ensaios de ELISA utilizando a proteína PPE recombinante;
5. Padronizar e determinar o desempenho de um teste baseado no uso de microesferas funcionais acopladas à proteína PPE recombinante para o imunodiagnóstico da esquistossomose por citometria de fluxo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de soro humano

Para os diferentes ensaios sorológicos empregados neste trabalho, foram selecionadas amostras de soro humano coletadas nos anos de 2001, 2002, 2005 e 2009 de indivíduos moradores do povoado de Virgem das Graças (VDG), no município de Ponto dos Volantes, uma área hiperendêmica para a esquistossomose localizada no Vale Jequitinhonha, norte do estado de Minas Gerais, que apresenta uma prevalência de aproximadamente 60% (PEREIRA et al., 2010). As amostras de soro destes indivíduos foram selecionadas uma vez que os mesmos foram avaliados quanto à presença de infecção pelo *S. mansoni* por PCR, para detecção de material genético do parasito nas fezes de acordo com Gomes e colaboradores (2009), e também pelo exame de Kato-Katz utilizando quatro amostras de fezes, sendo confeccionadas 12 lâminas da primeira amostra e duas lâminas das demais. Para compor o grupo de amostras controle negativo de indivíduos não infectados e não residentes em área endêmica para esquistossomose foram selecionadas amostras de soro de 19 indivíduos saudáveis que relataram não terem histórico prévio de esquistossomose. A ausência de reatividade do soro dos indivíduos saudáveis aos antígenos do *Schistosoma mansoni* foi confirmada em ensaios de imunofluorescência indireta e ELISA IgG contra antígenos solúveis do ovo, utilizando os kits comerciais IF: *Schistosoma mansoni* IgM (EUROIMMUN) e Anti-*Schistosoma mansoni* IgG (EUROIMMUN). O uso destas amostras neste trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do IRR (CAAE 96036418.7.0000.5091).

Amostras de soro de indivíduos moradores do município de Turiaçu no estado do Maranhão, que apresenta uma prevalência de 29%, também foram utilizadas neste trabalho. Estas amostras foram analisadas pelo exame de Kato-Katz utilizando três amostras de fezes, sendo confeccionadas 12 lâminas da primeira amostra e duas lâminas das demais. O uso destas amostras foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas (CAAE 21824513.9.3001.0019).

As amostras de soro dos indivíduos das duas áreas endêmicas também foram avaliadas quanto à reação contra antígenos solúveis de ovos do *S. mansoni* no ensaio de ELISA comercial Anti-*Schistosoma mansoni* IgG (EUROIMMUN), produzido na Alemanha. Porém, este teste não foi utilizado como critério de exclusão.

As amostras de soro utilizadas neste trabalho foram classificadas como a seguir: indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF) e não infectados de área endêmica para esquistossomose (NE), e indivíduos saudáveis de área não endêmica, *health donors* (HD).

Para padronização dos ensaios sorológicos, para cada imunoglobulina avaliada foi utilizado um *pool* de amostras de soro de indivíduos infectados que apresentaram alta reatividade contra antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* (POS Alto) e um *pool* de amostras de soro de indivíduos infectados que apresentaram baixa reatividade contra os mesmos antígenos (POS Baixo). Essa classificação das amostras de soro de indivíduos infectados foi feita por meio de ensaios de ELISA utilizando o kit comercial Anti-*Schistosoma mansoni* IgG (EUROIMMUN), baseada nos valores de absorbância. Foi utilizado também um *pool* de amostras de soro de indivíduos doadores saudáveis de área não endêmica (HD).

#### 4.2 Anticorpos comerciais

Os anticorpos comerciais que foram utilizados neste trabalho foram descritos na Lista de Anticorpos Comerciais (ANEXO I), contendo as informações de marca, lote e número de catálogo de cada um.

#### 4.3 Obtenção da sequência de DNA codificadora da proteína PPE de *Schistosoma mansoni*

A sequência nucleotídica correspondente à região codificadora (*coding sequence* - CDS) da proteína PPE de *S. mansoni* foi obtida do banco de dados *SchistoDB database Version 2.0* (Smp\_049300.3) (LUDOLF et al., 2014). Esta sequência possui 1.065 pb e foi obtida previamente por RT-PCR utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de esquistossômulos e os iniciadores *forward* (5'GGCTGGATCCATGTCTGGTGGGAAACAACATA3') e *reverse* (5'TGATAAGCTTGTGAGTAATTGCATGTTGCT 3'). O produto de PCR amplificado foi excisado de gel de agarose, purificado e então inserido no vetor de clonagem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) (RODRIGUES, 2014). A partir de um clone isolado foi extraído DNA plasmidial utilizando o *Plasmid Mini Kit* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante, e realizada uma digestão enzimática com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*, cujos sítios de restrição foram inseridos nos iniciadores *forward* e *reverse*, respectivamente. O inserto liberado foi purificado do gel de agarose e então inserido no vetor de expressão pET21a (Novagen), utilizado para transformação de bactérias *Escherichia coli* da cepa BL-21 (ROCHA, 2015). Este

vetor possui códons para a expressão de proteínas recombinantes em fusão com uma cauda de seis resíduos de histidina (6xHIS) na sua posição C-terminal.

A partir de um clone isolado foi feita uma nova extração de DNA plasmidial. A qualidade e a concentração do DNA extraído foi obtida no espectrofotômetro *NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000*. Foi realizada uma digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Promega) para confirmar a obtenção do plasmídeo pET21a-PPE. Para isso foi preparado um mix contendo 7µL de DNA (467µg/mL), 1µL da enzima de restrição *Bam*HI (10U/µL), 1µL de *Hind*III (10U/µL), 2,5µL do Tampão E 10x (Promega), 2,5µL de albumina sérica bovina (BSA) 10x (Promega) e 11µL de água nuclease *free*. A reação ocorreu a 37°C por 3h. Como controle, foi realizada a digestão de 4µL de DNA do plasmídeo pQE-40 (300µg/mL) com 1µL da enzima *Hind*III (10U/µL), 2,0µL do Tampão E 10x, 2,0µL de albumina sérica bovina (BSA) 10x e 11µL de água nuclease *free*. A análise dos produtos das reações de digestão enzimática foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Foi utilizado o padrão de pares de base *1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen) e o gel corado foi visualizado em luz ultravioleta (UV) utilizando equipamento *ImageQuant LAS 500* (GE HealthCare). Posteriormente foi realizado o sequenciamento parcial do plasmídeo pET21a-PPE pelo método de Sanger utilizando o *BigDye*<sup>™</sup> *Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (ThermoFisher), de acordo com as instruções do manual do fabricante, com os mesmos iniciadores utilizados na RT-PCR e também os iniciadores *T7 forward* e *T7 reverse*. Os produtos das reações de sequenciamento foram analisados no equipamento *3730 XL DNA Analyzer* (ThermoFisher) da Plataforma de Sequenciamento de DNA do Instituto René Rachou (IRR) – FIOCRUZ/MG.

O acesso à sequência de DNA utilizada foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número A64922E.

#### 4.4 Análises de sequência

A sequência de aminoácidos da PPE recombinante foi utilizada como *query* para busca de ortólogos com o *Protein Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTp) no banco de dados de sequência de proteínas não-redundantes do NCBI. A proteína mais similar de *Schistosoma haematobium* (XP\_012801453.1), *Schistosoma japonicum* (CAX78232.1), *Schistosoma bovis* (RTG85012.1), *Necator americanus* (XP\_013292984.1), *Trichuris trichiura* (CDW52492.1), *Ancylostoma duodenale* (KIH55703.1) e *Homo sapiens* (5LUM\_A) foram submetidas a um



alinhamento global par-a-par com a sequência de aminoácidos da PPE utilizando o programa *EMBOSS Needle* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>). Da mesma forma, a sequência da PPE recombinante também foi comparada à sequência da proteína G4V8Y7, correspondente ao gene Smp\_049300.3 do banco de dados do UniProt. As sequências da PPE de *S. mansoni* e as sequências similares de *S. haematobium* e *S. japonicum* foram submetidas ao alinhamento múltiplo utilizando o programa *CLUSTAL Omega (1.2.4) multiple sequence alignment* ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)) (MADEIRA *et al.*, 2019). A sequência de aminoácidos da proteína PPE, bem como sua massa molecular e ponto isoelétrico, foram obtidos utilizando as ferramentas *Translate* e *Compute pI/mW*, respectivamente, do pacote *ExpASy Bioinformatics Resource Portal* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Todos os programas foram utilizados em suas configurações padrão e as análises foram realizadas em DEZ/2019.

#### 4.5 Transformação bacteriana

Com o objetivo de expressar a proteína PPE de *S. mansoni* na forma recombinante, bactérias *E. coli* da cepa ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies), quimicamente competentes, foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo pET21a-PPE. Para isso, uma colônia da bactéria, previamente crescida em meio LB (Lúria Bertani) ágar contendo gentamicina (20µg/mL), foi inoculada em 15mL de meio LB com o mesmo antibiótico. A cultura foi mantida sob agitação constante a 200rpm e a 37°C, por 16h. Em seguida, 1mL do pré-inóculo foi adicionado a 115mL de LB também contendo gentamicina (20µg/mL). A cultura permaneceu sob agitação, nas mesmas condições, até atingir a densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) entre 0,4-0,5. Parte da cultura foi utilizada para preparação de estoques da bactéria ArcticExpress (DE3) em alíquotas de 1mL (700µL de inóculo + 300µL de glicerol 50%) e armazenadas em freezer -80°C para uso posterior. Cada 50mL da cultura foram centrifugados a 3500 x g, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram ressuspensos em 10mL de uma solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 0,1M e foram mantidos no gelo por 20min. Os tubos foram novamente centrifugados por 10min a 3500 x g, a 4°C, e o sobrenadante descartado. Os *pellets* foram finalmente ressuspensos em 2mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M.

Para a transformação, em uma alíquota de 100µL de bactérias quimicamente competentes foi adicionado 1µL (40ng) do plasmídeo pET21a-PPE. As bactérias permaneceram no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi dado o choque térmico a 42°C por 90 segundos e as bactérias foram colocadas no gelo novamente por dois minutos. Foram adicionados 900µL de meio LB e as bactérias foram mantidas a 37°C, sob agitação constante a 250rpm, por uma hora.

Após a incubação, a cultura foi plaqueada com o auxílio de uma alça de plástico estéril em meio LB ágar contendo ampicilina 100µg/mL e gentamicina 20µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16h para o crescimento das colônias de bactérias transformadas.

#### **4.6 Indução da expressão da proteína PPE recombinante em sistema procarioto**

Após a transformação de bactérias *E. coli* da cepa ArcticExpress (DE3) com o plasmídeo pET21a-PPE foi selecionado um clone para indução da expressão da proteína PPE recombinante. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do manual do fabricante da *ArcticExpress DE3 Competent Cells* (Agilent Technologies), com algumas modificações para a sua otimização e padronização. Foi feito um pré-inóculo em 30mL de meio LB acrescido dos antibióticos ampicilina (100µg/mL) e gentamicina (20µg/mL). A cultura permaneceu sob agitação constante a 200rpm, a 37°C, por 16h. Após o crescimento, o pré-inóculo foi adicionado a 750mL de meio LB também contendo os antibióticos ampicilina (100µg/mL) e gentamicina (20µg/mL). A cultura permaneceu sob agitação constante a 200rpm, a 30°C, por aproximadamente 3h, até atingir a OD<sub>600</sub> entre 0,4-0,5. Após atingir a densidade óptica desejada, foram adicionados 750µL de *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) 1M para indução da expressão da proteína PPE recombinante. Nesta etapa, a cultura permaneceu sob agitação, a 12°C, por até 16h. Ao longo do experimento de expressão, alíquotas de 1mL da cultura bacteriana foram recolhidas para avaliação do perfil de indução da expressão da proteína nos tempos 0h, 2h, 4h e 16h após a adição de IPTG. Após 16h, a cultura bacteriana foi centrifugada a 5.000 x g por 40min, a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* armazenado em *freezer* -80°C. As alíquotas que foram retiradas durante a indução da expressão da proteína foram centrifugadas por dez minutos a 4.000 x g, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 100µL de tampão da amostra de proteína *Laemmli Sample Buffer 2X* (TA2X) (Bio-Rad). As amostras foram fervidas a 100°C para desnaturação das proteínas, mantidas no gelo por dois minutos e centrifugadas a 16.000 x g por um minuto. A análise da expressão da proteína PPE recombinante foi realizada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% utilizando o sistema *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad). Foram aplicados 20µL das amostras referentes aos tempos T0 (antes da adição de IPTG), T2, T4 e T16 (2, 4 e 16 horas após a adição de IPTG). Foi utilizado o padrão de peso molecular de proteínas (5µL) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). A eletroforese foi realizada a 60V por 30 minutos, e posteriormente a 100V até que o corante azul de

bromofenol atingisse o final do gel. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e visualizados no equipamento *ImageQuant LAS 500* (GE HealthCare).

#### 4.7 Purificação da proteína PPE recombinante

O protocolo de purificação foi realizado de acordo com as instruções do manual do *Ni-NTA Fast Start Kit* (QIAGEN) em condições nativas, com algumas adaptações para a sua otimização. A coluna de purificação é composta por uma resina que contém íons de níquel e a proteína PPE recombinante com cauda de 6 histidinas na porção C-terminal deve ficar retida na coluna, devido à afinidade dos resíduos de histidina aos íons de níquel. O *pellet* de 750mL de cultura bacteriana, obtido após a indução da expressão da proteína, foi ressuspenso em 10mL de tampão de lise (Imidazol 20mM; Cloreto de Sódio 300mM; Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado 50mM - pH 8,0) contendo 100µL de Lisozima (100mg/mL) (QIAGEN), ½ comprimido do coquetel de inibidores de proteases *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) e 10µL de Benzonaze (25U/µL) (QIAGEN). Durante a lise, a solução foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada em banho-maria, a 37°C, por 3 vezes. Em seguida, a solução foi submetida a quatro ciclos de sonicação, com amplitude de 30%, por sete segundos e intervalo de um minuto em gelo entre cada ciclo, utilizando o sonicador *VC-750 - SONICS VIBRA-CELL*. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 14.000 x g por 30 minutos, a 4°C, sendo obtidos o sobrenadante, que corresponde à fração de proteínas solúveis, e o *pellet*, que corresponde à fração de proteínas insolúveis. Ambas as frações foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

A etapa seguinte do processo de purificação consistiu em equilibrar a coluna adicionando 2,5mL do tampão de lise, deixando-o passar por gravidade. Em seguida, os 10mL correspondentes à fração solúvel de proteínas obtida após a lise bacteriana foram aplicados na coluna e passaram por gravidade, sendo coletado o *flowthrough*. Em seguida, foram realizadas duas etapas de lavagem aplicando-se 4mL do tampão de lavagem 1 (Imidazol 50mM; Cloreto de Sódio 1M; Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado 50mM; Tween20 1% – pH 8,0) e uma lavagem com 4mL do tampão de lavagem 2 (Imidazol 50mM; Cloreto de Sódio 300mM; Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado 50mM – pH 8,0). Após todo o tampão de lavagem passar pela coluna por gravidade, a proteína foi eluída em tampão de eluição (Imidazol 500mM; Cloreto de Sódio 300mM; Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado 50mM – pH 8,0), sendo duas eluições em 750µL e duas em 375µL. A mesma coluna foi utilizada novamente

para mais dois ciclos de purificação a partir do *flowthrough* coletado no ciclo anterior. Foi recolhida uma alíquota de cada etapa dos três ciclos (*flowthrough*, lavagens e eluatos) para análise da purificação da proteína PPE recombinante em SDS-PAGE 12%. Para isso 10µL de cada alíquota coletada foram diluídos em 10µL tampão da amostra de proteínas *Laemmli Sample Buffer 2X* (Bio-Rad). As alíquotas foram fervidas a 100°C por cinco minutos, mantidas no gelo por dois minutos e centrifugadas a 16.000 x g por um minuto. Foram aplicados 20µL de cada amostra no SDS-PAGE 12%, juntamente com 8µL do padrão de peso molecular de proteínas *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). A eletroforese foi realizada a 60V por 30 minutos, e posteriormente a 100V até que o corante azul de bromofenol atingisse o final do gel. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e visualizados no equipamento *ImageQuant LAS 500* (GE HealthCare).

#### **4.8 Diálise da proteína PPE recombinante**

Após a obtenção da proteína PPE recombinante purificada, foi realizada a diálise dos eluatos em tampão salina-fosfato (PBS) 1x. Para isso foi utilizado o sistema de diálise *Mini Dialysis Kit - 1kDa cut-off* (GE HealthCare). Todo volume correspondente aos eluatos foi transferido para os tubos de diálise de 2mL que possuem em sua tampa uma membrana de diálise com poros de 1kDa. Os eluatos 3 e 4 de cada ciclo de purificação foram unidos em um mesmo sistema de diálise, e os eluatos 1 e 2 foram dialisados separadamente. Os tubos foram invertidos, com auxílio de um boiador, de modo que a parte da membrana ficasse em contato com a solução de PBS 1x. A solução permaneceu sob agitação constante e a diálise ocorreu à temperatura ambiente, por no mínimo 3h. Em seguida, os tubos foram retirados, invertidos novamente, e centrifugados a 1.000 x g, por cinco segundos, para recuperação de todo volume da amostra.

#### **4.9 Dosagem de proteína**

Após a diálise, a concentração da proteína PPE recombinante purificada foi determinada pelo método *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA) (SIGMA-ALDRICH). Em uma microplaca de 96 poços (NUNC-Maxsorp) foi preparada uma curva padrão de BSA (SIGMA-ALDRICH) nas concentrações de 0,2µg/µL; 0,4µg/µL; 0,6µg/µL; 0,8µg/µL e 1,0µg/µL, diluída em PBS partindo de uma concentração estoque de 10,0µg/µL. Foram aplicados 25µL de cada ponto da curva padrão e das amostras da proteína PPE dialisada, diluídas 1:10 em PBS, em duplicata. Em seguida foram adicionados 200µL do reagente de BCA, preparado na proporção

1:8 dos reagentes A e B do kit, respectivamente. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 562nm no leitor de microplacas *Spectramax* (Molecular Devices) utilizando o software *SOFTMAX PRO*.

#### **4.10 Western blotting com anticorpo monoclonal anti-histidina**

Para confirmar a expressão da proteína PPE recombinante em fusão com a cauda de 6xHIS foi realizado um ensaio de *western blotting* utilizando um anticorpo monoclonal IgG2a de camundongo Anti-His (GE HealthCare). Inicialmente, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) na qual foi utilizado 1µg da proteína PPE recombinante e 2,5µg de uma proteína de *S. mansoni*, chamada de spot 29, que também é expressa em fusão com 6xHIS. Esta foi utilizada como controle positivo do experimento. O ensaio foi realizado utilizando o sistema *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad), onde as amostras de proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose *Amersham Hybond Membrane* (GE HealthCare). A transferência ocorreu a 100V, por duas horas, a 4°C, em tampão de transferência 1x (Tris 25mM, Glicina 192mM e Metanol 20%). A membrana foi corada com o reagente de Ponceau (SIGMA) por cinco minutos, para a visualização prévia da transferência, lavada com água tipo I e mantida em uma solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico) diluído em tampão Tris-salina contendo Tween 20 (TBS-T) (NaCl 0,5M; Tris 0,02M pH 7,5; Tween-20 0,05%) por 16h, a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes com TBS-T por dez minutos, à temperatura ambiente, e incubada com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina, diluído 1:3.000 em TBS-T com 3% de leite em pó desnatado, por uma hora, sob agitação constante e a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente nas mesmas condições anteriores e incubada com o anticorpo secundário monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) (SouthernBiotech), diluído 1:5.000 em TBS-T com 3% de leite em pó desnatado, por uma hora, a temperatura ambiente. Após mais três ciclos de lavagem, a reação antígeno-anticorpo foi revelada pelo método de quimioluminescência, utilizando o kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE HealthCare). O equipamento utilizado para a captura da quimioluminescência foi o *ImageQuant LAS 500 Imager* (GE HealthCare).

#### **4.11 Western blotting com soro humano**

Após a confirmação do reconhecimento da proteína PPE recombinante por anticorpo monoclonal anti-His foi realizado um novo experimento de *western blotting* utilizando os *pools*

de soro INF, NE e HD. Inicialmente, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), onde foram aplicados 1 $\mu$ g e 2 $\mu$ g da proteína PPE recombinante e a transferência das proteínas para a membrana foi realizada como descrito na seção anterior. Com o auxílio de uma lâmina, a membrana foi cortada em tiras correspondentes a cada canaleta do gel onde foi aplicada a proteína. Em seguida, as tiras da membrana foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T, por 16 horas, a 4°C. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas e incubadas separadamente com os *pools* de soro INF, NE e HD, diluídos 1:500 em TBS-T com 3% de leite em pó desnatado, por duas horas, sob agitação constante. Após a incubação com os *pools* de soro, as tiras foram lavadas novamente nas mesmas condições anteriores e incubadas com o anticorpo secundário monoclonal anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA) diluído 1:10.000 em TBS-T com 3% de leite em pó desnatado, por uma hora. Como controle do experimento, uma tira de membrana contendo 2 $\mu$ g da PPE recombinante foi incubada com anticorpo monoclonal Anti-His conjugado a HRP (NOVEX) diluído 1:5.000 em TBS-T com 3% de leite em pó desnatado, por uma hora, sob agitação constante. Após mais três ciclos de lavagem, as tiras de membrana foram reveladas pelo método de quimioluminescência, como descrito anteriormente no item 4.10.

#### **4.12 Estabilidade e reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante**

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da proteína PPE recombinante, a mesma foi mantida em diferentes temperaturas (4°C e 25°C) e por diferentes tempos (0h, 2h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 168h). Aliquotas de 2,5 $\mu$ g da proteína de cada condição a que foi submetida foram separadas por SDS-PAGE 12% e os géis foram corados por *Coomassie Coloidal Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad). Foi utilizado o padrão de peso molecular de proteínas *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad).

Para avaliar a reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante, três diferentes lotes de expressão e purificação da proteína foram avaliados por SDS-PAGE 12%. Para isso, 1 $\mu$ g, 2,5 $\mu$ g e 5 $\mu$ g foram separados por eletroforese e os géis foram corados por *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad).

#### **4.13 Ensaio de ELISA**

Ensaio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foram realizados para avaliar a reatividade das imunoglobulinas IgG e IgG4 contra a proteína PPE recombinante. Para determinar as melhores condições dos testes, inicialmente foram realizados ensaios de

padronização. Para isso, microplacas de fundo chato de 96 poços (NUNC-Maxsorp) foram sensibilizadas com 100µL/poço da PPE recombinante em diferentes concentrações, variando de 0,25µg/mL a 15µg/mL, diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6. As placas permaneceram por 16h a 4°C e em seguida foram lavadas por quatro vezes com solução tampão PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), pH 7,0 – 7,2 (300µL/poço).

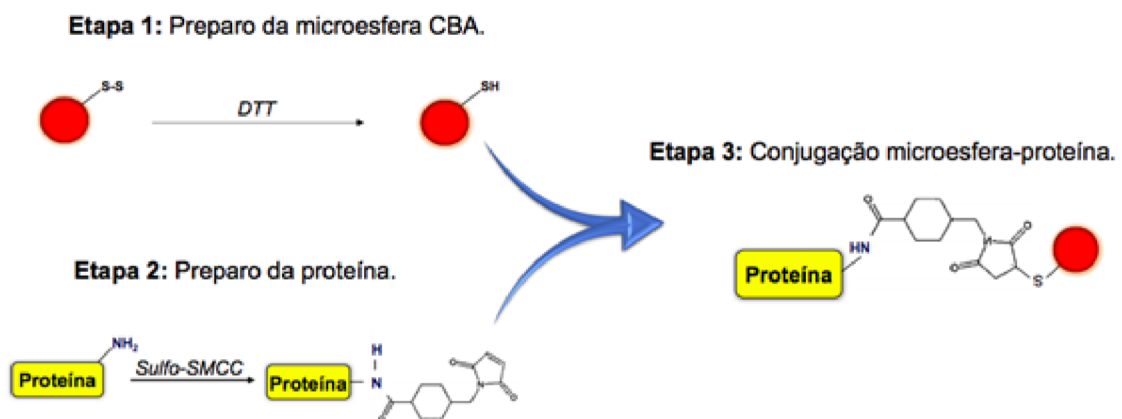
Para os ensaios de reatividade de IgG, foi realizado o bloqueio com PBS-T e 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) (GIBCO, USA) (300µL/poço), por duas horas, a 37°C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas por duas horas com diferentes diluições dos *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD (1:40, 1:80, 1:100, 1:160, 1:200, 1:320, 1:400, 1:500, 1:600 e 1:800) ou com as amostras individuais de soro dos indivíduos infectados (INF), não infectados de área endêmica (NE) e doadores saudáveis (HD) diluídas 1:40, 1:80 e 1:100 em PBS-T (100µL/poço). Após lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário monoclonal anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA) nas diluições testadas de 1:20.000, 1:40.000 e 1:60.000 (100µL/poço). Após novas lavagens, a reação foi revelada com 100µL/poço de substrato líquido 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Bio-Rad) por 30 minutos e interrompida com 50µL/poço de ácido sulfúrico 2M. Logo em seguida, os valores de absorbância foram adquiridos a 450nm em leitor automático de microplacas *Multiskan FC* (Thermo Scientific).

Para os ensaios de reatividade de IgG4 foram feitas algumas modificações no protocolo. O bloqueio foi realizado com PBS-T e 5% de leite em pó desnatado, a temperatura ambiente. Após lavagens, as placas foram incubadas com diferentes diluições dos *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD (1:40, 1:80, 1:100 e 1:200) ou com as amostras individuais de soro dos indivíduos infectados (INF), não infectados de área endêmica (NE) e doadores saudáveis (HD) diluídas 1:80 e 1:100 em PBS-T e 1% de leite em pó desnatado. Após lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG4 humana conjugado a biotina (SIGMA), diluído 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 em PBS-T e 1% de leite em pó desnatado. Após novas etapas de lavagens, foi realizada a incubação por uma hora, a temperatura ambiente, com estreptavidina-HRP (BD Pharmigen) diluída 1:4.000 (100µL/poço) em PBS-T e 1% de leite em pó desnatado. Após lavagens, a reação foi revelada com o substrato líquido 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Bio-Rad) por 30 minutos e interrompida com 50µL/poço de ácido sulfúrico 2M. Logo em seguida, os valores de absorbância foram adquiridos a 450nm em leitor automático de microplacas *Multiskan FC* (Thermo Scientific).

#### 4.14 Ensaios de citometria de fluxo com microesferas funcionais

Inicialmente 90µg da proteína PPE recombinante purificada (1µg/µL) foi acoplada à superfície de microesferas *Functional Bead E7* (BD Biosciences) de acordo com as instruções do manual do *Functional Bead Conjugation Buffer Set* (BD Biosciences). Resumidamente, o acoplamento ocorre por meio de uma ligação covalente entre o grupamento amina da proteína e os grupamentos sulfidrilas das microesferas. A ligação é formada usando o reagente *Sulfosuccinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyclohexane 1-carboxylate* (Sulfo-SMCC). O protocolo de acoplamento consiste em três etapas principais (Figura 3). A primeira etapa consiste no preparo das microesferas com o reagente Ditionitroto 1M (DTT), responsável pela formação dos grupos sulfidrilas na sua superfície. A segunda, na modificação da proteína por meio da reação de seu grupamento amina com a molécula de Sulfo-SMCC, formando uma espécie altamente reativa com grupos sulfidrilas. Após a troca de tampão da proteína modificada é realizada a terceira e última etapa, que consiste na conjugação propriamente dita das microesferas com a proteína, na presença de *N-Ethylmaleimide* (NEM) para estabilizar as ligações tio-éster formadas.

**Figura 3: Etapas do acoplamento de proteínas a microesferas funcionais.**



O DTT reduz o grupo dissulfeto, presente na superfície das microesferas, formando grupos sulfidrilas que reagem com o grupo maleimida inserido na porção amino-terminal da proteína por meio de uma reação química com Sulfo-SMCC. A ligação sulfidril-maleimida é estabilizada na presença de NEM, formando ligações tio-éster estáveis. Fonte: KER, 2016.

##### 4.14.1 Confirmação do acoplamento com anticorpo monoclonal anti-histidina

Primeiramente, foi realizado um ensaio para confirmação do acoplamento da proteína PPE recombinante às microesferas. Para isso, foi utilizada uma microplaca estéril *96-well Clear Round Bottom TC-treated Cell Culture Microplate* (FALCON). As microesferas acopladas



(6.000 microesferas/ $\mu$ L) foram homogeneizadas em vórtex por 5min e diluídas 1:50 em tampão *Wash Buffer* (BD™) previamente centrifugado a 400 x g por dez minutos. As microesferas diluídas foram então distribuídas na placa (50 $\mu$ L/poço), juntamente com 50 $\mu$ L do anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo anti-His, Penta-His (QIAGEN), diluído 1:500 e 1:1.000 em PBS-Wash (PBS 1x; albumina sérica bovina 0,5%; azida sódica 0,1%, pH 7,35). A placa foi cuidadosamente homogeneizada e incubada por três horas a temperatura ambiente, sob agitação constante de 500rpm em um agitador de microplacas NI-1154 (Nova Instruments), ao abrigo de luz. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 400 x g por dez minutos e vertida rapidamente. Em seguida, a placa foi novamente homogeneizada em vórtex. Foram adicionados 200 $\mu$ L/poço de PBS-Wash para lavagem e a placa foi centrifugada e vertida novamente. Para a reação secundária, foram adicionados 50 $\mu$ L/poço do anticorpo policlonal de cabra anti-IgG (H+L) de camundongo conjugado a biotina (ThermoFisher Scientific) diluído 1:1.000 e 1:5.000 em PBS-Wash, e em seguida, 30 $\mu$ L/poço de estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina, *PE Streptavidin* (BD Pharmigen™) diluída 1:400 em PBS-Wash. Após ser homogeneizada em vórtex, a placa foi incubada novamente por 2 horas, sob agitação constante de 500rpm. Após a incubação, foram pipetados 150 $\mu$ L/poço de PBS-Wash. A placa foi novamente centrifugada a 400 x g por 10min e vertida rapidamente. Para ressuspender as microesferas, foram adicionados 200 $\mu$ L/poço de PBS-Wash. A aquisição dos dados foi realizada no Citômetro de Fluxo BD FACSCalibur™ da Plataforma de Citometria de Fluxo do IRR, e a análise dos dados foi realizada nos *softwares FlowJo* (Tree Star, Ashland) e *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA).

#### 4.14.2 Ensaios de citometria de fluxo com soro humano

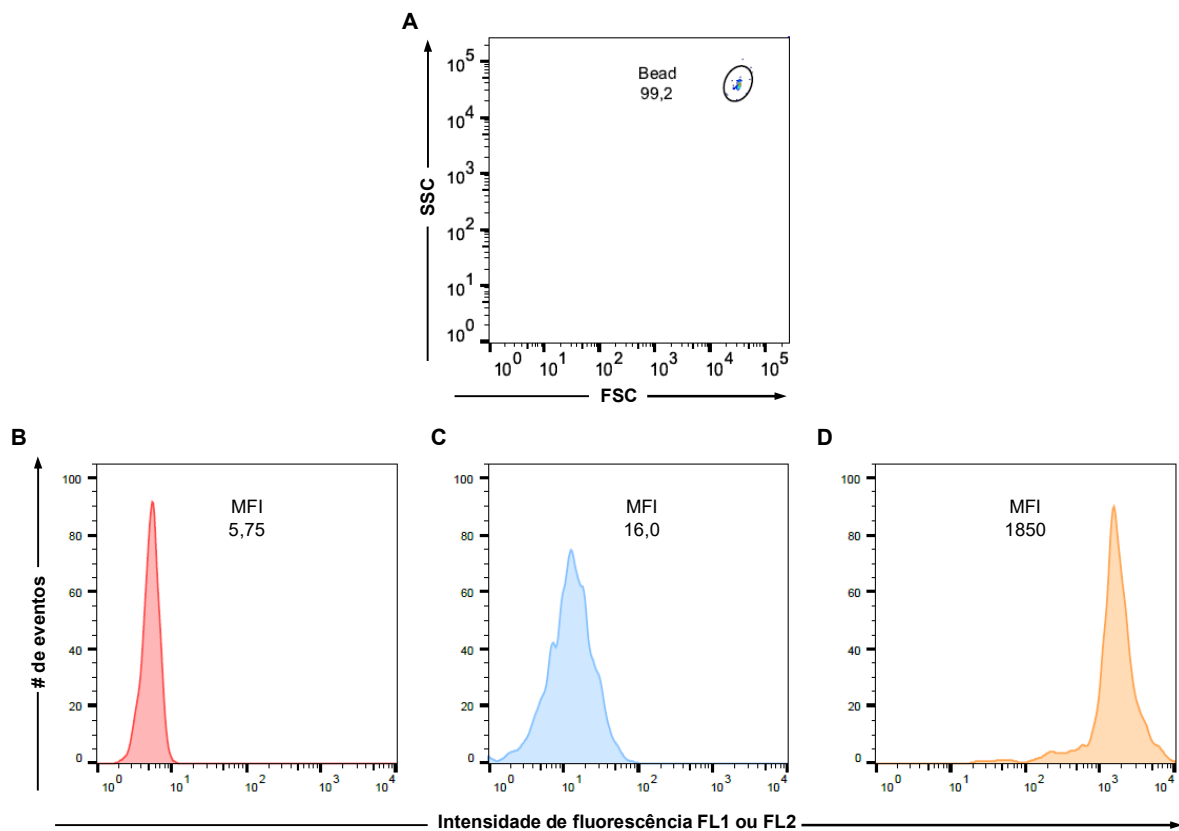
Após certificar a eficiência do acoplamento da PPE recombinante às microesferas, foram realizados os ensaios com as amostras de soro INF, NE e HD, em *pool* e individualmente, em diferentes diluições. Para os ensaios de reatividade de IgG, os *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD foram testados nas diluições 1:100, 1:500, 1:1.000 e 1:2.500, e as amostras de soro individuais, em uma diluição seriada (1:50 – 1:3.200). Nos ensaios com anti-IgG4, foi realizada uma curva de titulação com diluição seriada dos *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD (1:100 – 1:1.600) e das amostras de soro individuais (1:50 – 1:3.200). Para os ensaios com anti-IgA foi realizada uma curva de titulação com diluição seriada (1:50 – 1:3.200) dos *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD, e das amostras individuais.

Os ensaios foram realizados como descrito no item 4.14.1. Todas as amostras de soro foram centrifugadas a 15.000 x g por dez minutos antes de serem diluídas em PBS-Wash. Para a reação secundária, foram utilizados os anticorpos policlonal de cabra anti-IgG conjugado à biotina (Invitrogen) diluído 1:1.000 e 1:2.000 e anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG4 humana conjugado a biotina (SIGMA) nas diluições 1:500, 1:1.000 e 1:2.000, e estreptavidina conjugada a PE diluída 1:400. Também foi utilizado o anticorpo de cabra anti-IgA humana conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína – FITC (SIGMA) nas diluições 1:250, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSVersé da Plataforma de Citometria de Fluxo do IRR e a análise dos dados foi realizada nos *softwares* *FlowJo 10.0.8* (Tree Star, Ashland) e *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA).

#### **4.15 Estratégia de análise dos resultados dos ensaios de citometria de fluxo**

Para análise dos resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo foram adquiridas informações relativas ao tamanho (*Forward Scatter* - FSC), granulosidade (*Side Scatter* - SSC) e intensidade relativa de fluorescência de 500 microesferas/amostra. Primeiramente foi selecionada a população de microesferas acopladas à PPE recombinante na posição da microesfera E7 (Figura 4A). Em seguida foi obtido o histograma de fluorescência FL1 ou FL2 representando o MFI (Intensidade Média de Fluorescência, do inglês, *Median Fluorescence Intensity*) das microesferas acopladas (Figura 4B). O controle das microesferas acopladas incubadas apenas com o anticorpo conjugado está representado pelo histograma na figura 4C e a reação das microesferas acopladas incubadas com o anticorpo primário, seguido do anticorpo conjugado, está representada pela figura 4D.

**Figura 4 – Representação esquemática da estratégia de análise dos resultados dos ensaios de citometria de fluxo.**



Seleção da população de microesferas E7 utilizando os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (A). Histogramas de fluorescência FL1 ou FL2 representando o MFI obtido com as microesferas acopladas (B), com o controle das microesferas acopladas incubadas com o anticorpo conjugado (C) e com as microesferas acopladas na presença do anticorpo primário e do anticorpo conjugado (D). Fonte: a autora.

#### 4.16 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Brown-Forsythe para avaliar a igualdade de variância. Os resultados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, par a par, quando os valores de cada grupo não apresentaram igualdade de variância. Nestes casos, o valor de alfa foi ajustado de acordo com o número de comparações realizadas entre os grupos, sendo consideradas significativas as diferenças com valor de  $P < 0,02$ . Quando os valores analisados apresentaram igualdade de variância, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Nestes casos, foram consideradas significativas as diferenças com valor de  $P < 0,05$ .

Os pontos de corte para os diferentes ensaios, ELISA e citometria de fluxo, com as diferentes imunoglobulinas, anti-IgG, anti-IgG4 e anti-IgA, foram selecionados a partir da análise das curvas ROC (*Receiver-Operating Characteristic*), construídas com os valores de absorvância ou de MFI, cuja soma dos valores de sensibilidade e especificidade apresentasse maior valor (LINNET et al., 2012). Para análise de desempenho dos testes foram consideradas como amostras negativas as amostras de indivíduos saudáveis de área não endêmica (HD) e as amostras de indivíduos não infectados de área endêmica para esquistossomose (NE).

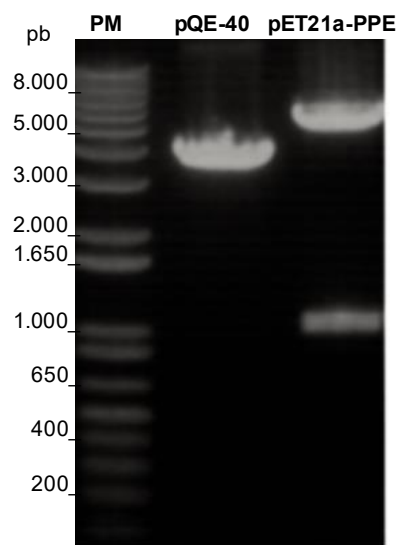
O desempenho de cada teste foi avaliado de acordo com a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP = proporção de indivíduos com teste positivo que apresentam a doença), valor preditivo negativo (VPN = proporção de indivíduos com teste negativo que não apresentam a doença), área sob a curva ROC (AUC), acurácia e índice Kappa ( $\kappa$ ). O índice Kappa foi calculado com relação aos testes que foram utilizados simultaneamente para caracterização das amostras de soro, sendo eles Kato-Katz e PCR, utilizando a ferramenta *online* do GraphPad, no endereço [www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/](http://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/), com intervalo de confiança de 95%. Os valores obtidos foram interpretados de acordo com a escala determinada por LANDIS & KOCH (1977).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise do plasmídeo pET21a-PPE por digestão com enzimas de restrição

A expressão da proteína PPE recombinante foi realizada utilizando a cepa de bactéria *E. coli* ArticExpress (DE3). Para isso, foi feita a extração de DNA plasmidial por *miniprep* a partir de um clone da bactéria BL-21 transformada com o plasmídeo pET21a-PPE, seguida de transformação de bactérias ArticExpress (DE3). A concentração do DNA obtida foi 467,00µg/mL. Para certificar a construção e obtenção do plasmídeo pET21a-PPE, previamente à transformação da bactéria ArticExpress (DE3) foi realizada a digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Estas enzimas foram as mesmas utilizadas para inserção da sequência correspondente à região codificadora do gene que codifica a proteína da PPE de *S. mansoni* (CDS) no plasmídeo pET-21a. Como pode ser observado na figura 5, de acordo com o padrão de pares de base, a digestão do plasmídeo pET21a-PPE liberou um fragmento de tamanho esperado de aproximadamente 1.000 pares de base (pb), que corresponde à CDS da PPE. Além disso, a banda correspondente ao vetor pET-21a apresentou o tamanho aproximado ao esperado de 5.443 pb. O plasmídeo pQE-40, utilizado na reação de digestão como controle, foi linearizado com a enzima de restrição *Hind*III e apresentou o tamanho esperado de 4.000 pb.

**Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão dos plasmídeos pQE-40 e pET21a-PPE.**



1,2µg de DNA do plasmídeo pQE-40 foi linearizado com a enzima de restrição *Hind*III e 3,3µg de DNA do plasmídeo pET21a-PPE foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Foi utilizado o padrão de pares de base *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Fonte: a autora.

## 5.2 Análise da sequência da proteína PPE recombinante

Foi realizado o sequenciamento parcial do plasmídeo pET21a-PPE com os mesmos iniciadores utilizados para amplificação da CDS de PPE e com os iniciadores T7 *forward* e T7 *reverse*. Após a análise das sequências obtidas, chegou-se a sequência de DNA consenso (Figura 6A). A sequência de aminoácidos da proteína traduzida está demonstrada na figura 6B, evidenciando a cauda de 6xHis na sua porção C-terminal. A proteína recombinante possui 367 aminoácidos. De acordo com a ferramenta *Compute pI/Mw*, a PPE recombinante possui ponto isoelétrico 6.46 e massa molecular 40.997,90 Da.

**Figura 6 – Sequência parcial do plasmídeo pET21a-PPE e de aminoácidos da proteína PPE recombinante.**

**A**

```
GGTCGCGGATCCATGTCTGGTGGGAAACAACATAACGCAGTTAGTATTCCCTGTGAATCGTGAGC
AACGGTCATTTGAGAAACAAAGACGTGACTTATTGACTGGCCTGGAACATGGGGGTGGTGCTCA
TCGTGGCAACTCAATCGCACCATACACGGAAGACTGGCCGAGTACAGTGGACAACCTGGATCGAC
TCCTCGTGGAAGAGATGGGATGACGACATGCGACGTTTGAGACGTGGAATGTTTGCATATTAC
CATTTGGATACTTTCTCCCATGGAATTTTGGAATAATCCATTTCGCATTAATGCACCAAATGGATCG
TCAAATCCAGGATATCCGAGAGAGAATGGGGTCAATGGATGTGCCGTCTACCGGTTCAGTGAAC
GACTTCTGAAGGACGCCTACGAAGTAGGTGAGGATGGCAAGGTACATTTCAAGGTACGATTCG
ATGCACAAGGTTTCGCTCCTCAGGACATCAATGTGACGTCGAGTGAGAACCCTGTGACGGTACA
CGCGAAGAAGGAGACGACGACCATGGTAGGAAGTGTAGTCGGGAGTTCTGTGCTATGGTGCAG
CTGCCGAAGAGTATTGATGATAGTCAACTGAAATGTCGCATGACAGATGATGGTGTTTTGATGT
TAGAGGCTCCAGTGAAGGTTGATCAGAACCAGTCGTTGACGCTGAACGAGTCTGGTCAGGTGGC
TGTTGACCGAAATCGGACAATCAGATTAAGGCAGTTCCTGCATCACAAGCTCTTGTTCGCGAAA
GGTGTTCATGGTCTGTGCTATGTGGATGATGGTTCAGGTGGGAAGCGACTGCATGTTGAAGTTC
CAGTGGACCCAGTGTACAAACCTGAAGACTGTTTTGTGAATGTTGACTCGAATCGTGTGTGGT
TAGTGGACGTCATCATAAGCAGAAGAGTGATCAACATGGAAGGTGAGCTCATTTCGCAGAGTTC
AGTCAGTCGTATGCGATTCAGAGACAGTTGATCCGTTATCTGTTTCTGCTCAGGTAGTTGGCA
ATACATTGGTATTGGAGGCGCCATTGGAGAAGCAACATGCAATTACTCACAAGCTTGCGGCCGC
ACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
```

**B**

```
MSGGKQHNAVSI PVNREQRSFEKQRRDLLTGLEHGGGAHRGNSIAPYTEDWPSTVDNWIDS SWK
RWDDMRRLRRGMFALLPLDTF SHGILENPFALMHQMDRQIQDIRERMGSLDVPSTGVSNDFLK
DAYEVGEDGKVFHFKVRFDAQGFAPQDINVTSS ENRVT VHAKKETT DGRKCSREFCRMVQLPKS
IDDSQLKCRMTDDGVLML EAPVKVDQNQSLTLNESGQVAVRPKSDNQIKAVPASQALVAKGVHG
LSYVDDGSGGKRLHVEVPVDPVYKPEDLFVNVD SNRVVSGRHHKQKSDQHGRSSSFAEFSQSY
AIPETVDPLSVSAQVVGNTLVLEAPLEKQHAI THKLAAALEHHHHHH
```

(A) Sequência de DNA consenso obtida pelo sequenciamento parcial do plasmídeo pET21a-PPE. Os nucleotídeos sublinhados correspondem às regiões de anelamento dos iniciadores *forward* e *reverse*, evidenciando os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, respectivamente, em itálico. Em cinza estão destacados os códons de iniciação (ATG) e de terminação (TGA). Em negrito estão marcados os códons correspondentes às seis histidinas. (B) Sequência de aminoácidos traduzida a partir da sequência de nucleotídeos obtida. Em cinza está evidenciada a cauda 6xHis na porção C-terminal. Fonte: a autora.

Com o objetivo de confirmar se a proteína recombinante expressa corresponde ao produto do gene Smp\_049300.3, a sequência de aminoácidos traduzida da sequência de DNA consenso foi comparada com a sequência polipeptídica G4V8Y7 depositada no banco de dados do UniProt (Figura 7), pertencente a uma família de pequenas proteínas de *heat shock* (HSP20). Estas sequências possuem 94,6% de identidade e 97,7% de similaridade.

**Figura 7 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da PPE recombinante com a proteína G4V8Y7.**

```

PPE      MSGGKQHNAVSIPVNREQRSFEKQRRDLLTGLEHGGGAHRGNSIAPYTEDW PSTVDNWID
G4V8Y7   MSGGKQHNAVSIPVNREQRSFERQRRDLLTGLEHSGGTHRGNLIGPYTEDW PSTVDSWIN
*****:*****.*:*****.*****.**:

PPE      SSWKRWDDDMRRLRRGMFALLPLDTFTHGILENPFALMHQMDRQIQDIRERMGSLDVPST
G4V8Y7   SSWRRWDEEMRRLRRGMFALLPLDTFTHGILENPFALMHQMDRHIQDIRERMGSM DVPST
***:***:*****:*****:*****:*****

PPE      GSVNDFLKDAYEVGEDGKVFHFVRFDAQGFAPQDINVTSSENRVTVHAKKETT DGRKCS
G4V8Y7   GSVSDFLKDAYEVGEDGKVFHFVRFDAQGFAPQDINVTSSENRVTVHAKKETT DGGKCS
***.*****

PPE      REFCRMVQLPKSIDDSQLKCRMTDDGVLMLLEAPVKVDQNQSLTLNESGQVAVR PKSDNQI
G4V8Y7   REFCRMVQLPKSIDDSQLKCRMTDDGVLMLLEAPVKVDQNQSLTLNESGQVAVR PKSDNQI
*****

PPE      KAVPASQALVAKGVHGLSYVDDGSGGKRLHVEVPVDPVYKPEDLFCVNVDSNR VVSVGRHH
G4V8Y7   KAVPASQALVAKGVHGLSYVDDGSGGKRLHVEVPVDPVYKPEDLFCVNVDSNR VVSVGRHH
*****

PPE      KQKSDQHGRSSSF AEFSSQSYAIPETVDPLSVSAQVVGNTLVLEAPLEKQHAI THKLAAL
G4V8Y7   KQKSGQYGKSSSF AEFSSQSYAIPETVDPLSVSAQVVGNTLVLEAPLEKQHAI TH-----
***.*:*****

PPE      EHHHHHH
G4V8Y7   -----

```

A sequência de aminoácidos da PPE recombinante foi comparada com a sequência G4V8Y7 depositada no banco de dados do UniProt, correspondente ao gene Smp\_049300.3, utilizando o programa *EMBOSS Needle*. (\*) resíduos de aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos conservados; (.) aminoácidos semi-conservados; ( ) aminoácidos não conservados e (-) *gaps*. Fonte: a autora.

A sequência de aminoácidos da PPE recombinante de *S. mansoni* foi também utilizada para busca de ortólogos em diferentes espécies de *Schistosoma*: *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. bovis*. O alinhamento entre a sequência de aminoácidos da PPE das principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem está demonstrado na figura 8. A sequência da proteína recombinante de *S. mansoni* apresentou maior identidade com as sequências ortólogas de *S. japonicum* e *S. haematobium* (68,9 e 87%, respectivamente) e, dentre as espécies de *Schistosoma* avaliadas, uma menor identidade com a sequência ortóloga de *S. bovis* (55,9%).

A mesma análise foi realizada com sequências ortólogas de outros geo-helminhos, como: *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Ascaris lumbricoides*. Entretanto, a sequência da PPE recombinante de *S. mansoni* apresentou uma baixa identidade com a sequência ortóloga de *N. americanus* (10,1%), *Trichuris trichiura* (14,5%), *Ancylostoma duodenale* (10,5%) e não apresentou similaridade significativa a nenhuma sequência de *A. lumbricoides*. Foi também encontrada uma sequência de *Homo sapiens* ortóloga a PPE de *S. mansoni*. Porém, estas sequências apresentaram baixos índices de identidade (7,3%).

**Figura 8 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da PPE recombinante com proteínas ortólogas de *Schistosomas*.**

```

S. japonicum   MSGTHQNHAVSI PVNREQCSFPRHRHELLQNVGKASKSGQLGSVV PYTEDW PSSVSNWIE 60
S. mansoni    MSGGKQHNAVSI PVNREQR SF EKQRDLLTGLEHGGGAHRGNS IAPYTEDW PSTVDNWID 60
S. haematobium MSGGQHHQAVSI PVNREQRSFERQRDLLTGLEHGGGTHRGNLIAPYTEDW PSTVDSWIN 60
*** ::::***** ** ::::** .. : . : . : *****:*.**

S. japonicum   SSLKSWDKEMERLRRGMFALLPMDRFMVG I SHDPLGMMHEMDRHIEELQNGMGLSAVAPL 120
S. mansoni    SSWKRWDDMRRLRRGMFALLPLDT FSHG I LENP FALMHQMDRQI QDIRERMGSLDVPST 120
S. haematobium SSWRRWDEDMRRLRRGMFALLPLDNFTHGVWENP FALMHQMDRHI QDIRERMGSM DVPST 120
** : ** .*.*****:* * * : .*:..**:*:*:*::: ** *

S. japonicum   GSTSDYLKDAYEVGDDGKVFHFKVRFDAQGFAPEDINVTSSDNRVTVHAKKETTGGKKCS 180
S. mansoni    GSVNDFLKDAYEVGEDGKVFHFKVRFDAQGFAPQDINVTSSENRVTVHAKKETT DGRKCS 180
S. haematobium GSVSDFLKDAYEIGEDGKVFHFKVRFDAQGFAPQDINVTSSENRVTVHAKKETT DGGKCS 180
** .*:*****:*.*****:*****:*****:*****:*****.* ***

S. japonicum   HEFCRMIQLPKS IENNQLKCRLLTDDGVLMLLEAPVKVGENKSLTMNESGQVGIQPKSASQI 240
S. mansoni    REFCRMVQLPKS IDDSQLKCRMTDDGVLMLLEAPVKVDQNSLTLNESGQVAVRPKSDNQI 240
S. haematobium REFCRMVQLPQRIDDSMTGRQ-----TENQSLTLNESGQVGVPRPKSDNQI 226
:*****:***: *::: . * :*:***:*****.:*** .**

S. japonicum   QAVPASQALT VKGCQGLTVLDDGAGGKRLHVEVQLDPVYR PEDLCVNVDSNRVVVSGRHY 300
S. mansoni    KAVPASQALVAKGVHGLSYVDDGSGGKRLHVEVPVDPVYKPEDLFVNVDSNRVVVSGRHH 300
S. haematobium KAVPASQALVAKGVHGLSYVDDGSGGKRLHVEVPVDPVYKPEDLCVNVDSNRVVVSGRHH 286
:*****.* ** :** :***:***:***** :****:*** ** :*****:

S. japonicum   KQKTDARRKSSSFAEFSQSYSIPETVDPLTVSAQVVDNMLVVEAPMMKQHEIAH 354
S. mansoni    KQKSDQHGRSSSFAEFSQSYAIPETVDPLSVSAQVVGNTLVLEAPLEKQHAITH 354
S. haematobium KQKSGQYKSSSFAEFSQSYAIPETVDPLSVSAQVVGNTLVLEAPLEKQHAITH 340
***:. :*****:*****:*****.* **:**: ** *:*

```

A sequência de aminoácidos da PPE recombinante de *S. mansoni* foi comparada com as sequências ortólogas de *S. japonicum* (CAX78232.1) e de *S. haematobium* (XP\_012801453.1) utilizando o programa *CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment*. (\*) resíduos de aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos conservados; (.) aminoácidos semi-conservados; ( ) aminoácidos não conservados e (-) gaps. Fonte: a autora.

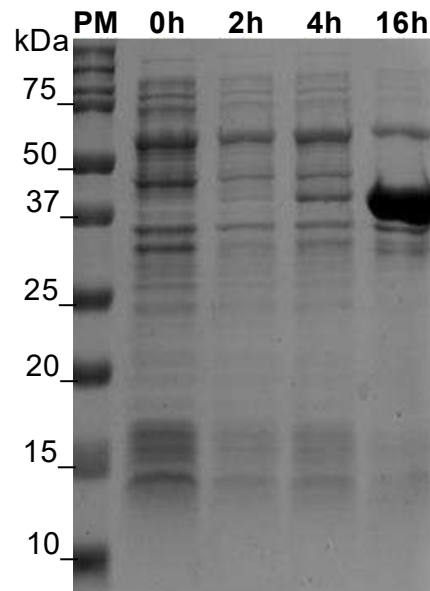
### 5.3 Indução da expressão da proteína PPE de *Schistosoma mansoni* em sistema procarioto

O perfil de indução da expressão da proteína PPE recombinante por bactérias *E. coli* da cepa ArcticExpress (DE3) foi avaliado nos tempos 0h, 2h, 4h e 16h após a adição de IPTG, sendo a cultura mantida a temperatura de 12°C. Por meio de SDS-PAGE foi possível observar a forte expressão de uma proteína que apresenta massa molecular de aproximadamente 40kDa,



como esperada para PPE recombinante, após 16h de indução. Uma banda de mesma massa molecular foi observada muito mais fracamente nos tempos de 2h e 4h, e não foi observada no tempo 0h, antes da indução com IPTG (Figura 9).

**Figura 9 - Análise de indução da expressão da proteína PPE recombinante por SDS-PAGE.**

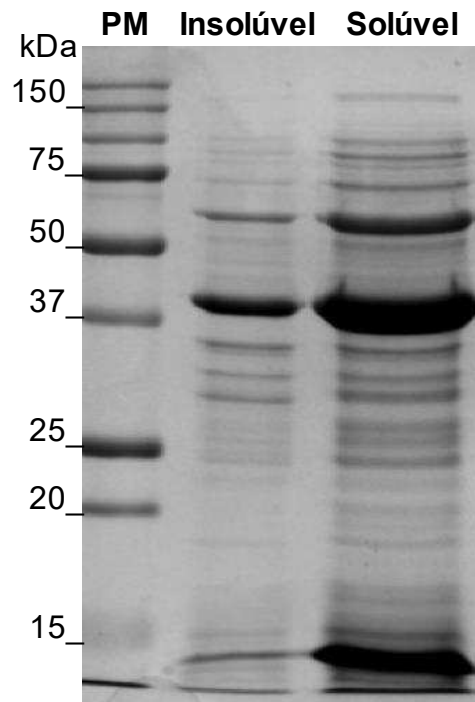


A indução da expressão da proteína PPE recombinante em bactérias *E. coli* da cepa ArcticExpress (DE3) foi realizada a 12°C e avaliada antes (0h) e 2h, 4h e 16h após adição de IPTG, por SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

#### **5.4 Avaliação da expressão da PPE recombinante nas frações de proteínas solúveis e insolúveis do lisado bacteriano**

Após a análise de indução da expressão da proteína PPE recombinante foi iniciado o protocolo de purificação da proteína. Para isso, o *pellet* da cultura bacteriana, obtido após 16h de indução com IPTG, foi lisado em condições não desnaturantes, sendo obtidas as frações de proteínas solúveis e insolúveis após centrifugação do lisado bacteriano. Por meio de SDS-PAGE foi observado que a proteína PPE recombinante está presente em maior quantidade na fração de proteínas solúveis, obtida do sobrenadante de bactérias lisadas, quando comparada com a fração de proteínas insolúveis, obtida a partir do *pellet* de bactérias lisadas (Figura 10).

**Figura 10 - Análise das frações insolúvel e solúvel do lisado bacteriano por SDS-PAGE.**



Após a lise bacteriana em condições não desnaturantes, seguida de centrifugação, as proteínas obtidas no *pellet* e no sobrenadante (frações insolúvel e solúvel) foram analisados por SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

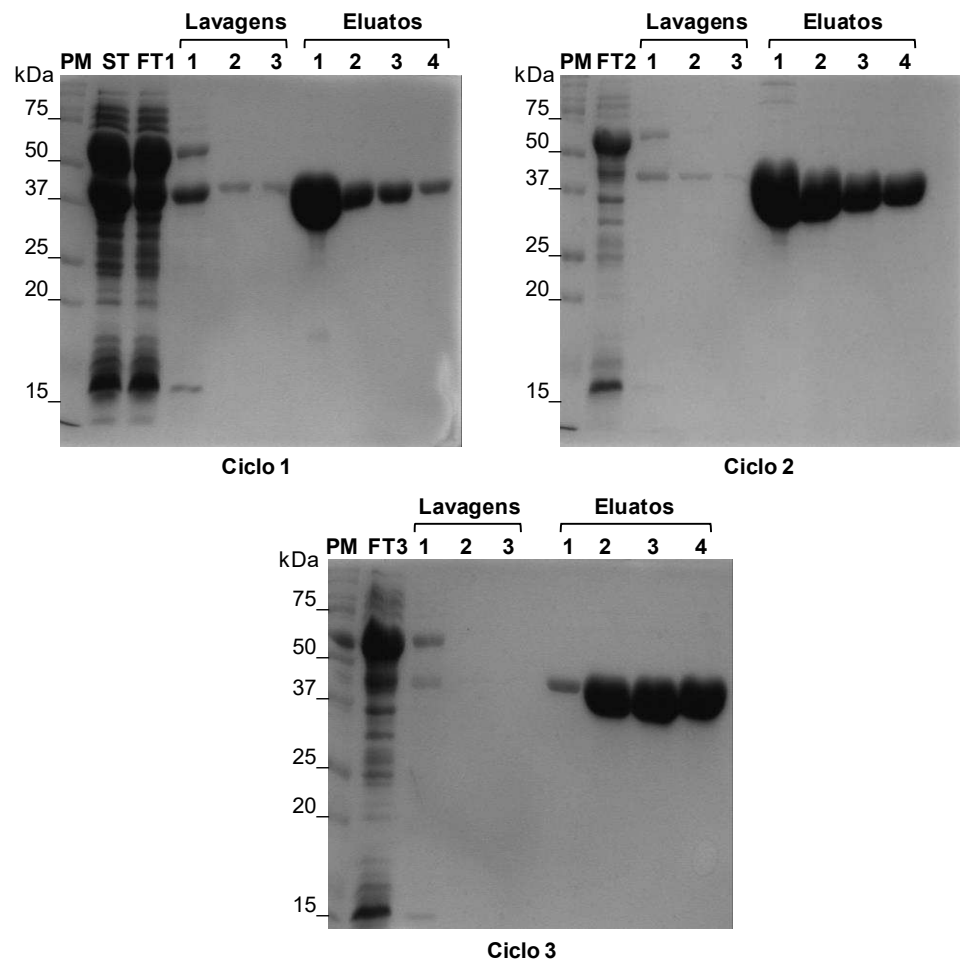
### 5.5 Purificação da proteína PPE recombinante

Após a lise das bactérias em condições não desnaturantes, a fração solúvel do lisado bacteriano foi utilizada para purificação da proteína PPE recombinante, uma vez que foi observada uma maior quantidade da proteína nessa fração. A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando colunas contendo íons níquel. Foram realizados 3 ciclos de purificação utilizando a mesma coluna. Uma alíquota de cada etapa dos ciclos de purificação foi retirada para a avaliação em SDS-PAGE. No primeiro ciclo de purificação foi obtido o *Flow-Through* (FT1) após a aplicação do extrato proteico solúvel na coluna (ST). É possível observar na figura 11 que uma quantidade significativa da proteína PPE, expressa em fusão com a cauda 6xHis, ficou retida na coluna devido a alta afinidade dos resíduos de histidina pelo níquel. Nas etapas de lavagem (Lavagens 1 a 3 - ciclo 1), utilizando uma concentração de imidazol 50mM, foi observada uma pequena quantidade da proteína PPE sendo deslocada das colunas, juntamente com algumas proteínas da bactéria. Já nas etapas de eluição, onde a proteína foi eluída na presença de imidazol 500mM (Eluatos 1 a 4 - ciclo 1), observou-se que a proteína PPE recombinante foi obtida em quantidade e nível de pureza

satisfatórios. Nos demais ciclos de purificação (ciclos 2 e 3) onde foram aplicados, utilizando a mesma coluna, os FT1 e FT2, respectivamente, foi observado um perfil muito semelhante em todas as etapas de obtenção da proteína.

Após o processo de purificação, a proteína recombinante obtida foi submetida à diálise em PBS para retirada do imidazol e, em seguida, foi realizada a dosagem de proteínas. O rendimento da expressão e purificação da proteína PPE recombinante foi de aproximadamente 1mg/30mL de cultura.

**Figura 11 - Avaliação da purificação da PPE recombinante por SDS-PAGE.**

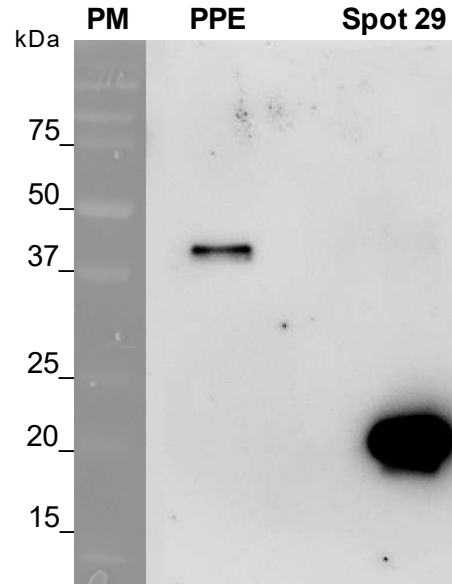


A purificação da proteína recombinante foi realizada em colunas de cromatografia de afinidade ao níquel do *Ni-NTA Fast Start Kit* (QIAGEN). Foram realizados 3 ciclos de purificação (ciclos 1 a 3). No primeiro ciclo foi utilizado o extrato solúvel (ST) obtido da lise bacteriana e nos demais, o *flow through* (FT) do ciclo anterior. Aliquotas de cada etapa do processo de purificação foram analisadas em SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

### 5.6 Detecção da proteína PPE recombinante por *western blotting* com anticorpo anti-histidina

Após a obtenção da proteína PPE recombinante purificada foi realizado um experimento de *western blotting* utilizando um anticorpo monoclonal anti-histidina para certificar que a banda observada no SDS-PAGE, com massa molecular esperada para a PPE recombinante, corresponde a esta proteína expressa em fusão com uma cauda 6xHis na sua posição C-terminal. Foi utilizado como controle do experimento uma proteína de *S. mansoni* denominada spot 29, também expressa em fusão com 6xHis, que apresenta uma massa molecular de aproximadamente 20kDa. Como observado na figura 12, apenas uma banda de massa molecular de aproximadamente 40kDa foi reconhecida pelo anticorpo anti-histidina, sugerindo que a mesma corresponde a proteína PPE recombinante purificada. A banda correspondente à proteína spot 29 também foi revelada com massa molecular esperada, com maior intensidade por ter sido utilizada em maior quantidade.

**Figura 12 - *Western blotting* com a proteína PPE recombinante purificada e com anticorpo anti-histidina.**

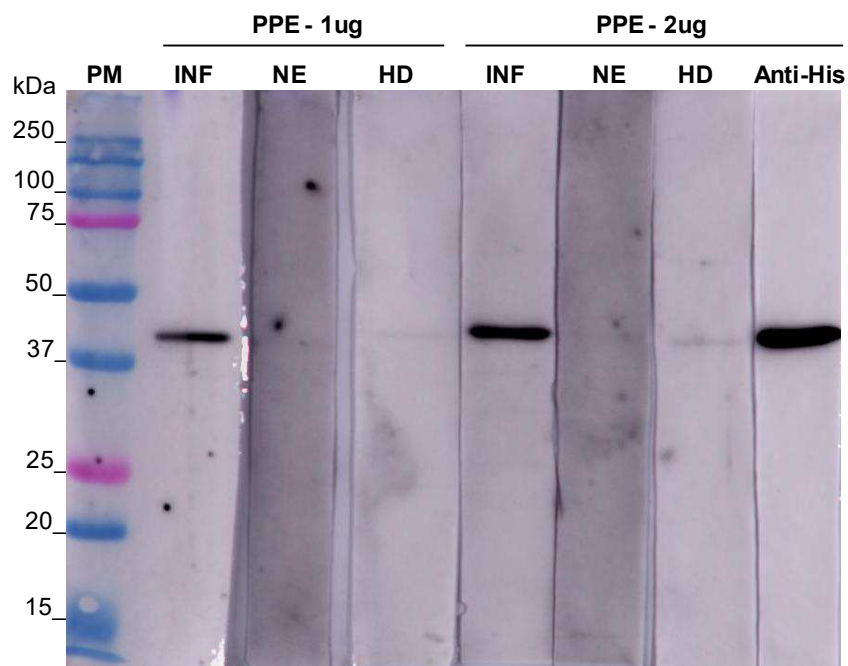


Foi utilizada uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) para transferência de 1 $\mu$ g da proteína PPE purificada e 2,5 $\mu$ g do controle spot 29. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal IgG2a de camundongo Anti-His (GE Healthcare), diluído 1:3.000, e posteriormente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (Southern Biotech), diluído 1:5.000. A reação na membrana foi revelada por quimioluminescência utilizando o kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) e a imagem foi adquirida no *ImageQuant LAS 500 Imager* (GE HealthCare). Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

### 5.7 Avaliação da imunorreatividade da PPE recombinante contra diferentes amostras de soro humano por *western blotting*

Após a confirmação do reconhecimento da proteína PPE recombinante pelo anticorpo monoclonal anti-histidina, foi realizado um novo ensaio de *western blotting* utilizando *pool* de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados de área endêmica para esquistossomose (NE), e de indivíduos doadores saudáveis (HD) de área não endêmica, para avaliar a imunorreatividade da proteína recombinante. Para isso, tiras de membrana de nitrocelulose contendo 1 $\mu$ g e 2 $\mu$ g da proteína PPE recombinante foram incubadas separadamente com os diferentes *pools* de soro. Como controle, uma tira de membrana contendo 2 $\mu$ g da PPE foi incubada com anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina. Como observado na figura 13, uma proteína de massa molecular de aproximadamente 40kDa, correspondente à PPE recombinante, foi fortemente reconhecida por anticorpos presentes no *pool* de soro de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF), não havendo reconhecimento pelo *pool* de soro de indivíduos não infectados de área endêmica (NE). A mesma banda reagiu muito fracamente com o *pool* de soro de indivíduos saudáveis (HD). A banda que reagiu com o soro humano corresponde à PPE recombinante, uma vez que uma banda de mesma massa molecular foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-histidina.

**Figura 13 - Western blotting com a PPE recombinante e amostras de soro humano.**



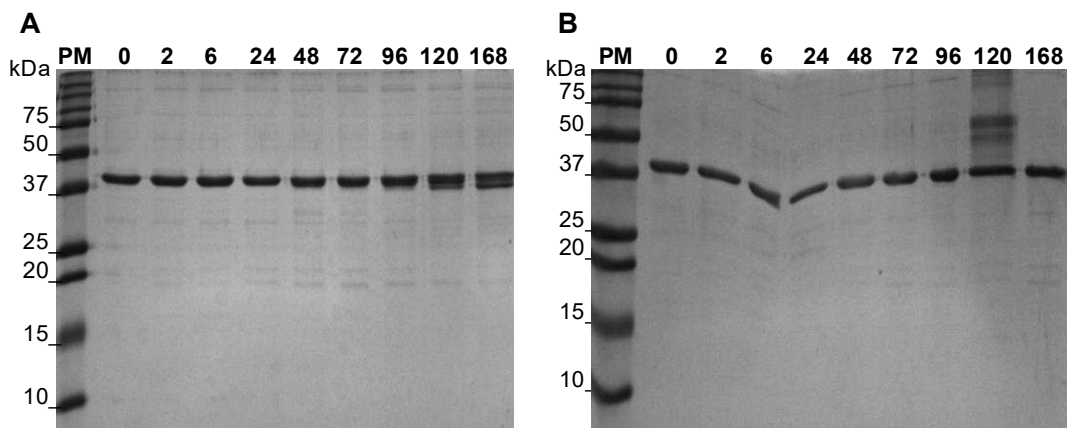
A proteína PPE recombinante purificada (1 $\mu$ g e 2 $\mu$ g) foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (GE HealthCare) e após bloqueio, tiras desta membrana foram incubadas separadamente

com *pools* de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE) de área endêmica para esquistossomose, e de doadores saudáveis (HD), diluídos 1:500. Posteriormente, as tiras foram incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA), diluído 1:10.000. Como controle, 2 $\mu$ g da PPE foram incubados com anticorpo monoclonal de camundongo anti-His (C-Term)-HRP (Novex), diluído 1:5.000. As tiras foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) e a imagem foi adquirida no *ImageQuant LAS 500 Imager* (GE HealthCare). Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

### 5.8 Avaliação da estabilidade da PPE recombinante

Para avaliar a estabilidade da proteína PPE recombinante purificada, a mesma foi mantida em PBS em diferentes condições de temperatura, 4°C e temperatura ambiente (25°C), por até 7 dias (0h, 2h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 168h). Alíquotas contendo 2,5 $\mu$ g da proteína foram separadas por SDS-PAGE 12%, corado com Azul de Coomassie Coloidal. Como mostrado nas figuras 14A e 14B, tanto a 4°C quanto a temperatura ambiente, a proteína PPE recombinante se manteve estável por todo período avaliado, sem apresentar sinais de degradação de proteína, como aparecimento de arraste no gel.

**Figura 14 - Avaliação da estabilidade da proteína PPE recombinante mantida em diferentes condições.**



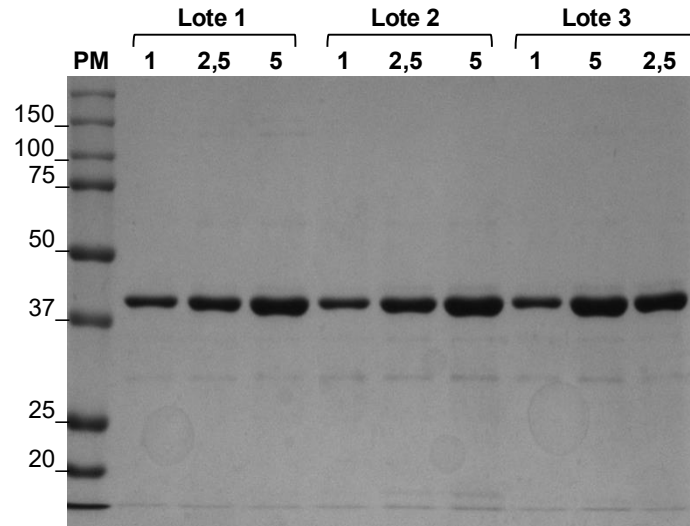
SDS-PAGE 12% corado com Azul de Coomassie Coloidal (G-250) contendo 2,5 $\mu$ g da PPE recombinante mantida a 4°C (A) e a temperatura ambiente (B) por até 168 horas. Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

### 5.9 Avaliação da reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade de expressão e de purificação de diferentes lotes da proteína PPE recombinante, 1,0 $\mu$ g, 2,5 $\mu$ g e 5,0 $\mu$ g da proteína obtida em três diferentes lotes de produção foram avaliados por SDS-PAGE 12%. Como mostrado na figura 15, a

proteína foi obtida com o mesmo nível de pureza nos três lotes avaliados, sendo mantida sem degradação em PBS, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por 12 meses, desde que foi obtido o primeiro lote.

**Figura 15 - Avaliação da reprodutibilidade de obtenção da proteína PPE recombinante por SDS-PAGE.**



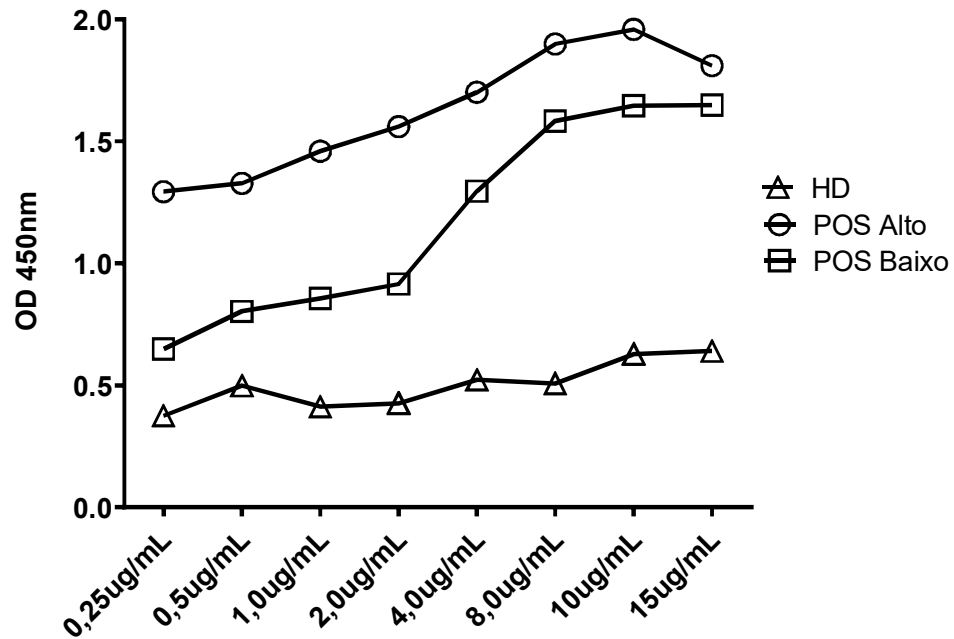
SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* contendo 1,0 $\mu\text{g}$ , 2,5 $\mu\text{g}$  e 5,0  $\mu\text{g}$  da PPE recombinante obtida em três diferentes lotes de produção. Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular (PM) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Fonte: a autora.

### 5.10 Avaliação da reatividade de IgG e IgG4 contra a PPE recombinante em ensaios de ELISA

A reatividade das imunoglobulinas IgG e IgG4 contra a proteína PPE recombinante foi avaliada em ensaios de ELISA utilizando as amostras de soro INF, NE e HD. Nos ensaios de padronização foram utilizados *pools* de amostras de soro previamente classificadas como POS Alto e POS Baixo, e um *pool* de amostras de soro de indivíduos doadores saudáveis (HD).

Para padronizar o ensaio de reatividade de IgG, inicialmente, diferentes concentrações de proteína foram avaliadas (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 15,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Como mostrado na figura 16, a partir da concentração de proteína de 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , houve uma maior diferença entre os valores de absorbância dos *pools* das amostras de soro POS Alto e POS Baixo em relação aos valores de absorbância obtidos para o *pool* de amostras HD.

**Figura 16 – Avaliação da concentração da PPE recombinante no ensaio de ELISA para análise da reatividade de IgG total.**

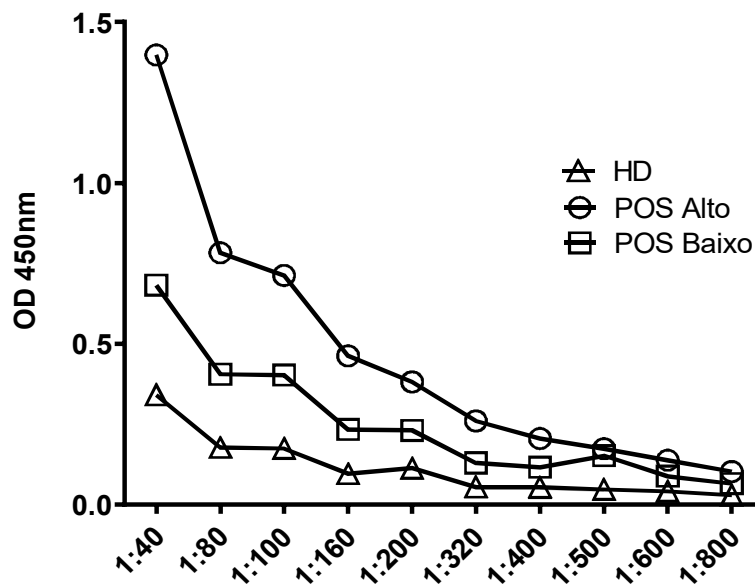


Diferentes concentrações da PPE recombinante (0,25 a 15 µg/mL) foram avaliadas utilizando os *pools* de amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo diluídos 1:100 e o anticorpo anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA) na diluição 1:60.000. A reatividade dos diferentes *pools* de amostras de soro foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). Fonte: a autora.

A diluição das amostras de soro a ser utilizada no teste foi determinada a partir de uma curva de titulação utilizando os *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD nas diluições 1:40, 1:80, 1:100, 1:160, 1:200, 1:320, 1:400, 1:500, 1:600 e 1:800. A figura 17 mostra que a partir da diluição 1:100, não existe uma separação satisfatória entre os *pools* de soro POS Alto e POS Baixo em relação ao *pool* de amostras HD.



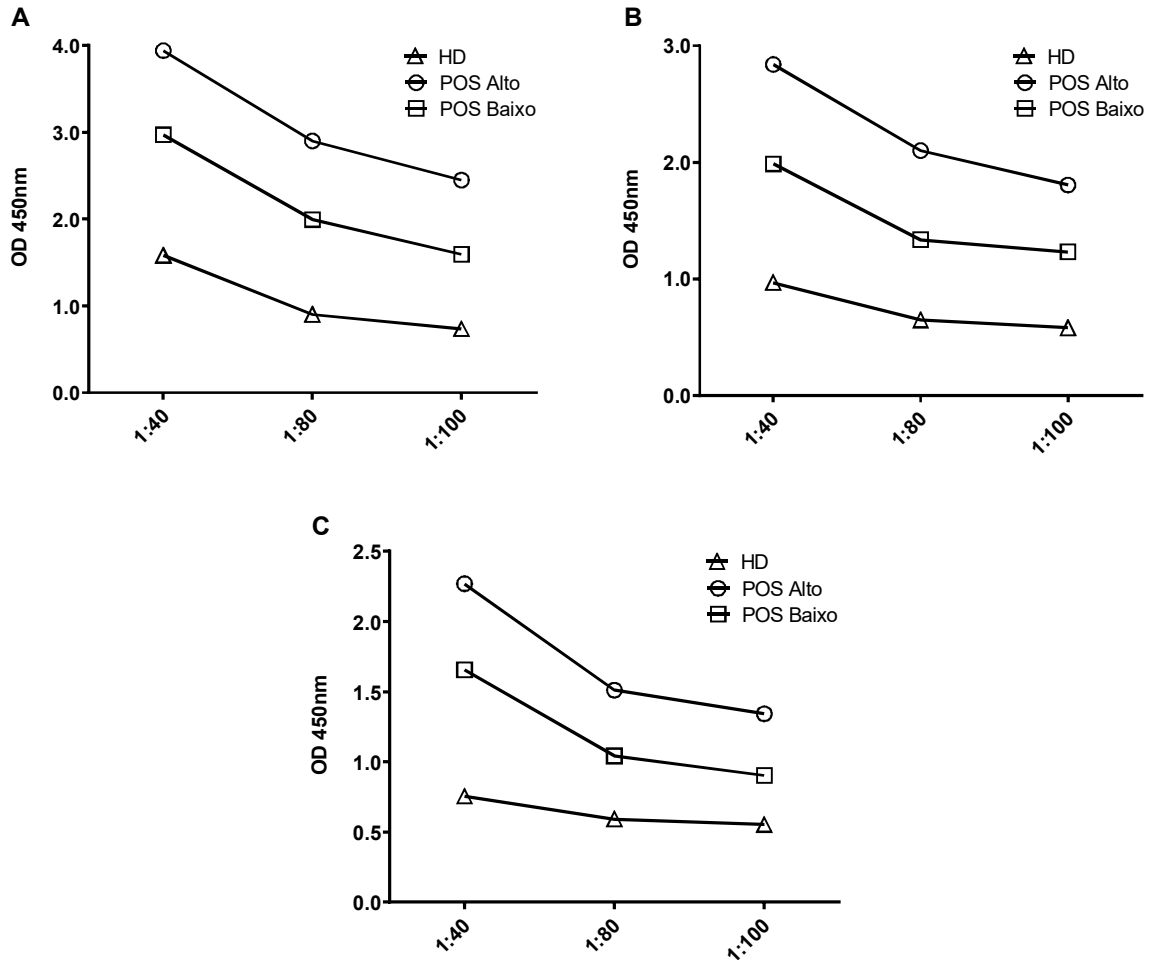
**Figura 17 – Curvas de titulação dos *pools* de soro no ensaio de ELISA para análise da reatividade de IgG total contra PPE recombinante.**



Curvas de titulação dos *pools* das amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo nas diluições de 1:40 a 1:800 utilizando a proteína PPE recombinante na concentração de 8,0 $\mu$ g/mL e o anticorpo anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA) na diluição 1:60.000. A reatividade dos diferentes *pools* de amostras de soro foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). Fonte: a autora.

Também foram testadas diferentes diluições do anticorpo anti-IgG humana conjugado a HRP, sendo avaliadas as diluições 1:20.000, 1:40.000 e 1:60.000. Neste ensaio, os *pools* das amostras de soro foram utilizados nas diluições 1:40, 1:80 e 1:100. Como observado na figura 18, nas três diluições do anticorpo conjugado utilizadas, houve uma distinção entre os valores de absorbância obtidos para os *pools* de soro POS Alto e POS Baixo em relação ao *pool* das amostras HD.

**Figura 18 – Curvas de titulação do anticorpo anti-IgG total conjugado a HRP no ensaio de ELISA.**



Curvas de titulação do anticorpo anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA) nas diluições (A) 1:20.000, (B) 1:40.000 e (C) 1:60.000, utilizando a proteína PPE recombinante na concentração de 8,0µg/mL, e os *pools* de amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo nas diluições 1:40, 1:80 e 1:100. A reatividade dos diferentes *pools* de amostras de soro foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). Fonte: a autora.

Em seguida foram realizados os ensaios de ELISA para avaliação da reatividade de IgG com as amostras de soro disponíveis para este estudo (INF: n=18; NE: n=20; HD: n=19) nas diluições 1:40, 1:80 e 1:100. De acordo com as condições determinadas nos ensaios de padronização, a proteína PPE recombinante foi utilizada na concentração de 8,0µg/mL e o anticorpo anti-IgG humana, na diluição 1:60.000.

Como demonstrado na figura 19A, utilizando as amostras de soro na diluição 1:40, os valores de absorbância obtidos para as amostras de soro INF foram significativamente mais altos do que o observado para as amostras NE ( $P=0,0013$ ) e HD ( $P<0,0001$ ). O ponto de corte desse ensaio, calculado de acordo com os índices de sensibilidade e especificidade obtidos a

partir da construção de uma curva ROC considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados, foi 0,679. A partir da curva ROC foi determinado o desempenho do teste que apresentou sensibilidade de 83,33% (IC 95% 60,78-94,16%), especificidade de 64,1% (IC 95% 48,42-77,26) e área sob a curva (AUC) 0,83 (IC 95% 0,722-0,942) (Figura 20A e Tabela 2).

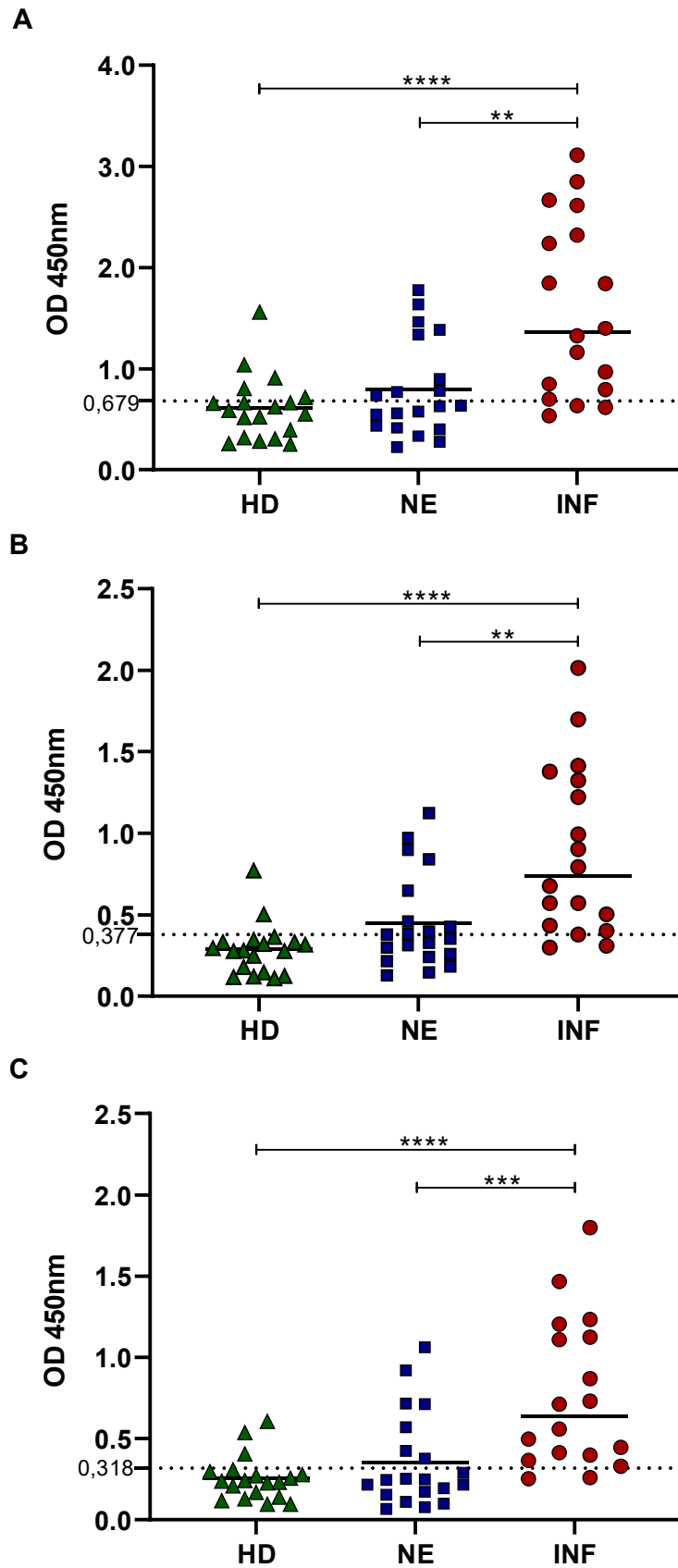
Utilizando as amostras de soro na diluição 1:80 (Figura 19B), os valores de absorvância obtidos para as amostras de soro INF também foram significativamente mais altos do que o observado para as amostras NE ( $P=0,0017$ ) e HD ( $P<0,0001$ ). O ponto de corte desse ensaio foi 0,377, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados. O teste apresentou sensibilidade de 84,21% (IC 95% 62,43-94,48%), especificidade de 71,79% (IC 95% 56,22-83,46) e área sob a curva (AUC) 0,81 (IC 95% 0,682-0,939) (Figura 20B e Tabela 2).

Com as amostras de soro diluídas 1:100 (Figura 19C), os valores de absorvância obtidos para as amostras de soro INF também foram significativamente mais altos do que os observado para as amostras NE ( $P=0,0006$ ) e HD ( $P<0,0001$ ). O ponto de corte desse ensaio foi 0,318, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados. O teste apresentou sensibilidade de 88,89% (IC 95% 67,20-98,03%), especificidade de 74,36% (IC 95% 58,92-85,43) e área sob a curva (AUC) 0,86 (IC 95% 0,769-0,955) (Figura 20C e Tabela 2).

A tabela 1 descreve o resultado do teste de diagnóstico sorológico com a proteína PPE recombinante nos ensaios de ELISA para avaliar a reatividade de IgG das amostras de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE + HD), nas diluições 1:40, 1:80 e 1:100. Utilizando as amostras de soro na diluição 1:40, foram detectados 15 indivíduos verdadeiramente positivos, 3 indivíduos falso-negativos, 25 verdadeiramente negativos e 14 falso-positivos. Com as amostras de soro na diluição 1:80, foram detectados 15 indivíduos verdadeiramente positivos, 3 indivíduos falso-negativos, 28 verdadeiramente negativos e 11 falso-positivos. Já com as amostras de soro diluídas 1:100, foram detectados 16 indivíduos verdadeiramente positivos, 2 indivíduos falso-negativos, 29 verdadeiramente negativos e 10 falso-positivos.

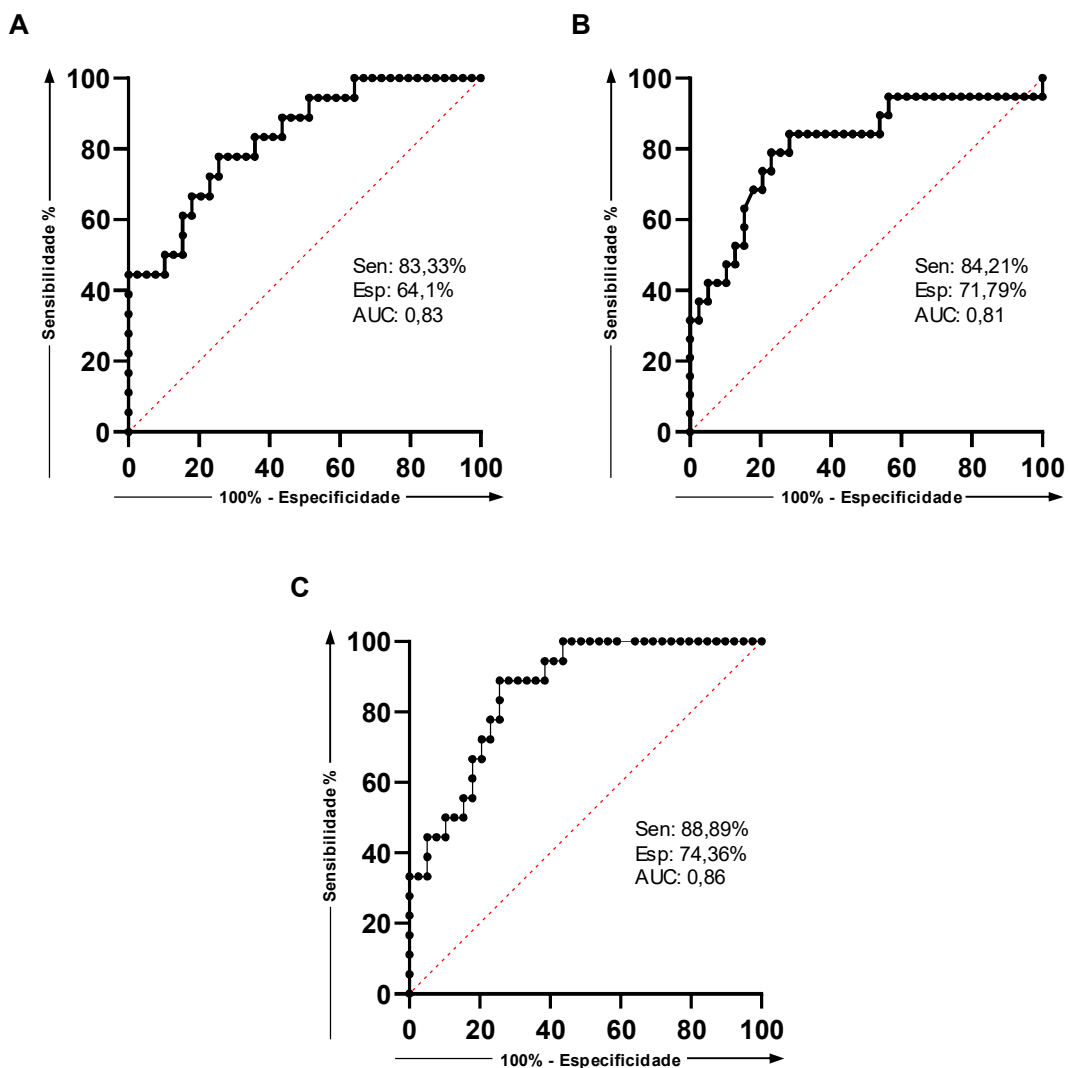
A tabela 2 resume o desempenho dos três testes. Como observado, o desempenho do teste com as amostras de soro diluídas 1:100 foi superior aos demais testes utilizando as amostras de soro diluídas 1:40 e 1:80.

Figura 19 - Análise da reatividade de IgG total contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por ELISA.



A reatividade das amostras de soro dos grupos HD (n=19), NE (n=20) e INF (n=18) diluídas 1:40 (A), 1:80 (B) e 1:100 (C) foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). O anticorpo anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA) foi utilizado na diluição 1:60.000. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA) utilizando o teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Brown-Forsythe. Posteriormente foi aplicado o teste de Mann-Whitney para análise par a par dos dados não paramétricos, com nível de confiança de 98%. A diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,02$ ) está representada nos gráficos pelos asteriscos. O valor dos pontos de corte está indicado pelas linhas pontilhadas e a mediana dos valores de absorbância está representada por um traço. Fonte: a autora.

**Figura 20 - Curvas ROC dos testes de reatividade de IgG total contra a proteína PPE recombinante nos ensaios de ELISA.**



As curvas ROC foram construídas a partir da representação gráfica da sensibilidade *versus* o complemento da especificidade dos testes com as diluições de soro 1:40 (A), 1:80 (B) e 1:100 (C). Para o cálculo da especificidade, os grupos HD e NE foram considerados não infectados. Os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva (AUC) estão mostrados na figura. Fonte: a autora.

**Tabela 1 – Resultado do teste de diagnóstico sorológico utilizando a proteína PPE recombinante em ensaios de ELISA para detecção de IgG total específica**

<b>Esquistossomose</b>			
<b>IgG (1:40)</b>	INFECTADO	NÃO INFECTADO*	Total
POSITIVO	15 (VP)	14 (FP)	29
NEGATIVO	3 (FN)	25 (VN)	28
Total	18	39	57

<b>IgG (1:80)</b>	INFECTADO	NÃO INFECTADO*	Total
POSITIVO	15 (VP)	11 (FP)	26
NEGATIVO	3 (FN)	28 (VN)	31
Total	18	39	57

<b>IgG (1:100)</b>	INFECTADO	NÃO INFECTADO*	Total
POSITIVO	16 (VP)	10 (FP)	26
NEGATIVO	2 (FN)	29 (VN)	31
Total	18	39	57

VP: Verdadeiro positivo; VN: Verdadeiro negativo; FP: Falso positivo; FN: falso negativo.

\* Não infectado = HD + NE. Fonte: a autora.

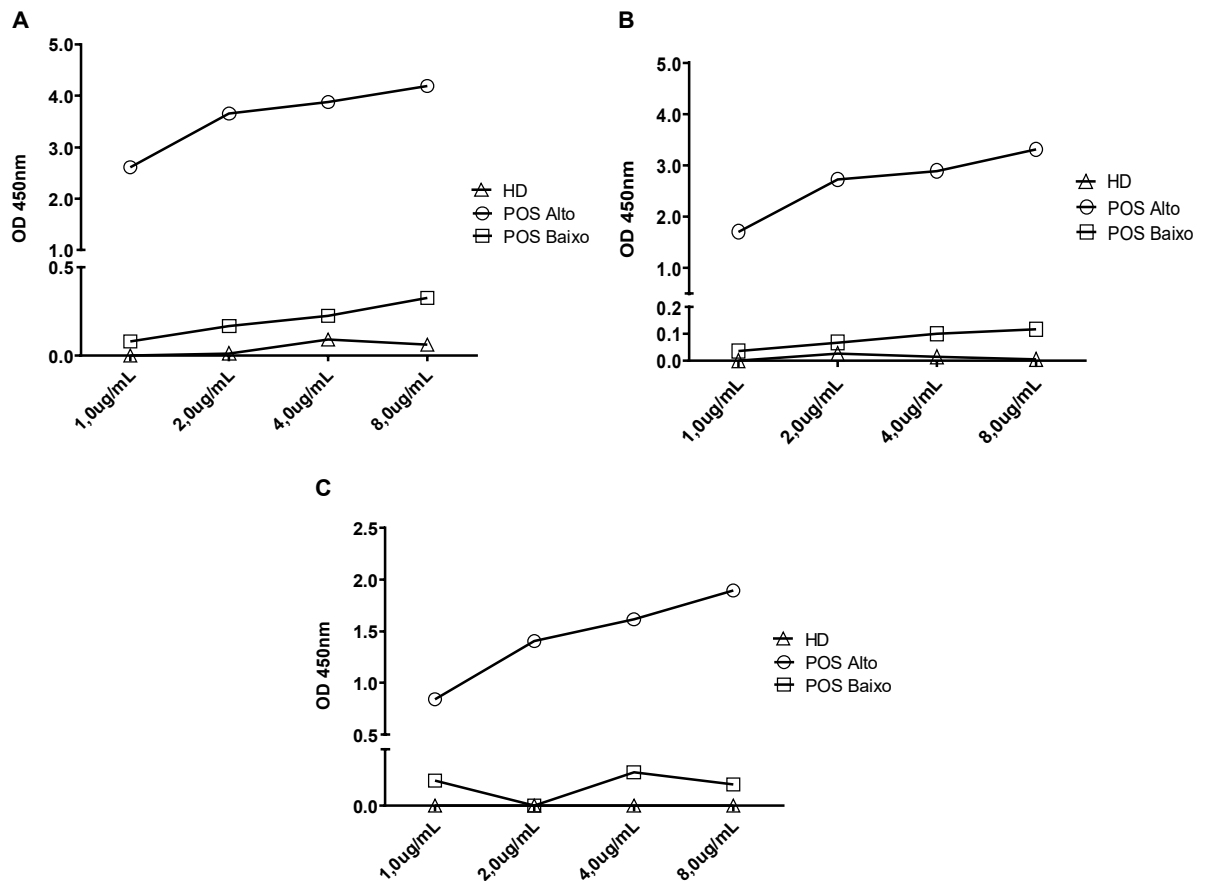
**Tabela 2 – Desempenho dos testes de diagnóstico sorológico por ELISA utilizando a proteína PPE recombinante e imunoglobulina IgG**

Teste	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	VPP	VPN	Acurácia	Kappa ( $\kappa$ ) (IC 95%)
<b>IgG (1:40)</b>	83,33% (60,78-94,16)	64,1% (48,42-77,26)	52%	89%	70%	0,41 (0,19-0,63)
<b>IgG (1:80)</b>	84,21% (62,43-94,48)	71,79% (56,22-83,46)	58%	90%	75%	0,49 (0,27-0,71)
<b>IgG (1:100)</b>	88,89% (67,20-98,03)	74,36% (58,92-85,43)	62%	94%	79%	0,56 (0,36-0,77)

IC: Intervalo de confiança; VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo. Fonte: a autora.

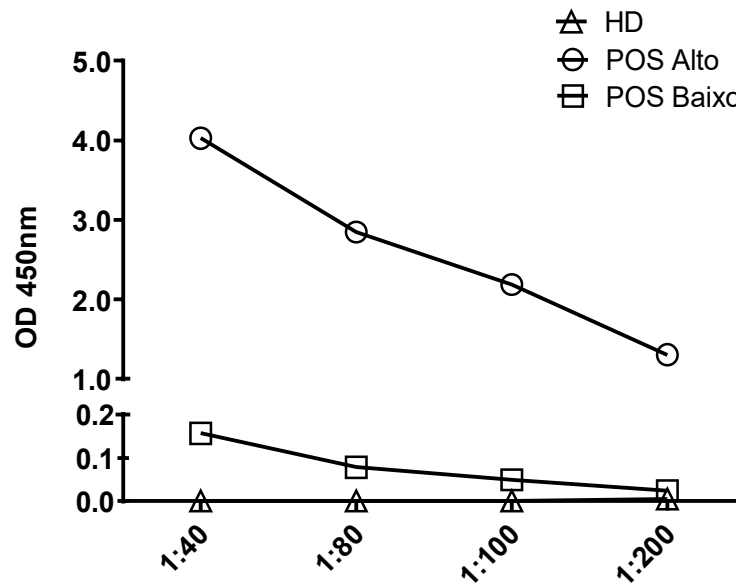
Para padronizar o ensaio de reatividade de IgG4, diferentes concentrações da proteína PPE recombinante foram avaliadas: 1,0 $\mu$ g/mL, 2,0 $\mu$ g/mL, 4,0 $\mu$ g/mL e 8,0 $\mu$ g/mL, juntamente com diferentes diluições do anticorpo anti-IgG4 humana conjugado à biotina (1:20.000, 1:40.000, 1:80.000). Como observado na figura 21A, na concentração da proteína PPE recombinante de 2,0 $\mu$ g/mL, utilizando o anticorpo anti-IgG4 humana conjugado na diluição 1:20.000, foi observada uma diferença no valor de absorvância que distingue os *pools* das amostras de soro POS Alto e POS baixo, em relação ao valor de absorvância obtido para HD. Na diluição do anticorpo conjugado 1:40.000 (Figura 21B), só é possível observar uma diferença entre os *pools* POS baixo e HD na concentração de 8,0 $\mu$ g/mL da proteína PPE recombinante. Já na diluição 1:80.000 (Figura 21C), não é possível distinguir o *pool* POS baixo e HD em nenhuma concentração da proteína avaliada. As diluições das amostras de soro a serem utilizadas foram determinadas a partir de uma curva de titulação utilizando os *pools* das amostras de soro POS Alto, POS Baixo e HD nas diluições 1:40, 1:80, 1:100 e 1:200 (Figura 22).

**Figura 21 – Avaliação da concentração da proteína PPE recombinante e da diluição do anticorpo anti-IgG4 humana nos ensaios de ELISA.**



Diferentes concentrações da PPE recombinante (1,0 a 8,0 $\mu$ g/mL) foram avaliadas utilizando os *pools* de amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo diluídos 1:100 e o anticorpo anti-IgG4 humana conjugado à biotina (SIGMA) nas diluições (A) 1:20.000, (B) 1:40.000 e (C) 1:80.000. A estreptavidina-HRP (BD Pharmigen) foi utilizada na diluição 1:4.000. A reatividade dos diferentes *pools* de amostras de soro foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). Fonte: a autora.

**Figura 22 – Curvas de titulação dos *pools* de soro no ensaio de ELISA para análise da reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante.**



Curvas de titulação dos *pools* das amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo nas diluições de 1:40 a 1:200 utilizando a proteína PPE recombinante na concentração de 2,0 $\mu$ g/mL e o anticorpo anti-IgG4 humana conjugado à biotina (SIGMA) na diluição 1:20.000. A estreptavidina-HRP (BD Pharmigen) foi utilizada na diluição 1:4.000. A reatividade dos diferentes *pools* de amostras de soro foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). Fonte: a autora.

Em seguida foram realizados os ensaios de ELISA para avaliação da reatividade de IgG4 com as amostras de soro disponíveis (INF: n=17; NE: n=20; HD: n=19) nas diluições 1:80 e 1:100. De acordo com as condições determinadas nos ensaios de padronização, a proteína PPE recombinante foi utilizada na concentração de 2,0 $\mu$ g/mL, o anticorpo anti-IgG4 humana conjugado à biotina na diluição 1:20.000 e a estreptavidina-HRP na diluição 1:4.000.

Como mostrado na figura 23A, utilizando as amostras de soro na diluição 1:80, os valores de absorbância obtidos para as amostras de soro INF foram significativamente mais altos apenas em relação aos valores observados para as amostras HD ( $P=0,0004$ ). O ponto de corte foi calculado de acordo com os índices de sensibilidade e especificidade obtidos a partir da construção de uma curva ROC, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados. O ponto de corte deste ensaio foi 0,084. A partir da curva ROC foi determinado o



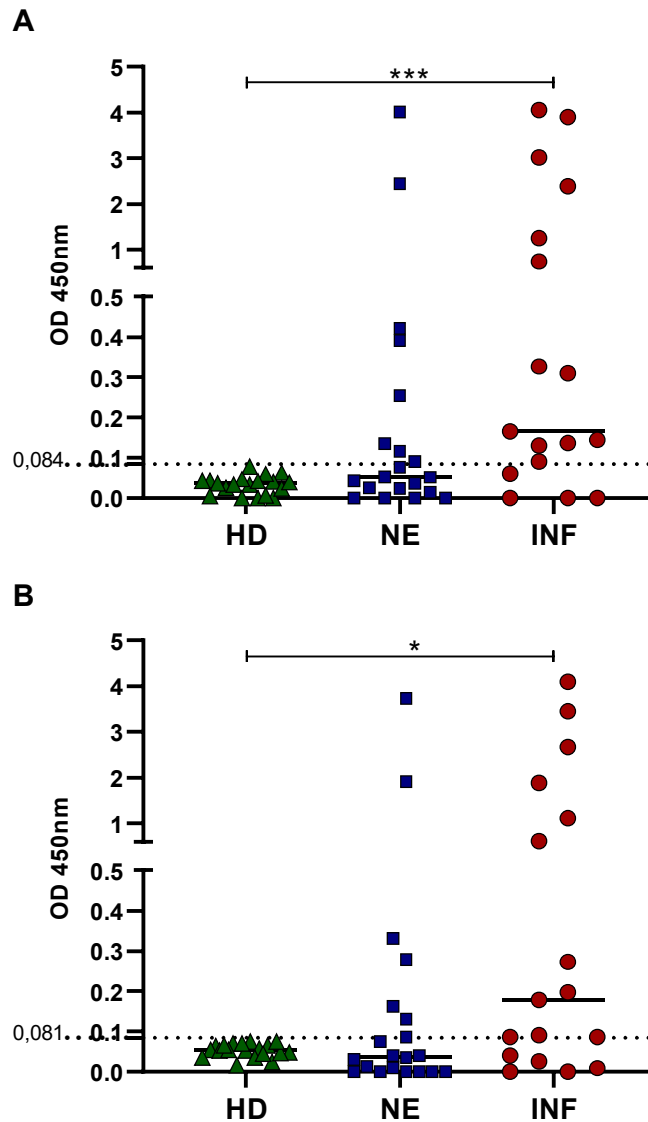
desempenho do teste que apresentou sensibilidade de 76,47% (IC 95% 52,74-90,44%), especificidade de 79,49% (IC 95% 64,47-89,22) e área sob a curva (AUC) 0,75 (IC 95% 0,592-0,919) (Figura 24A e Tabela 4).

Utilizando as amostras de soro na diluição 1:100 (Figura 23B), os valores de absorbância obtidos para as amostras de soro INF apresentaram uma diferença significativa apenas em relação aos valores observados para as amostras do grupo HD ( $P=0,0207$ ). O ponto de corte deste ensaio foi 0,081, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados. Este teste apresentou sensibilidade de 70,59% (IC 95% 46,87-86,72%), especificidade de 82,05% (IC 95% 67,33-91,02) e área sob a curva (AUC) 0,70 (IC 95% 0,531-0,877) (Figura 24B e Tabela 4).

A tabela 3 mostra o resultado do teste de diagnóstico sorológico com a proteína PPE recombinante nos ensaios de ELISA para avaliar a reatividade de IgG4 das amostras de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE + HD), nas diluições 1:80 e 1:100. Utilizando as amostras de soro na diluição 1:80, foram detectados 13 indivíduos verdadeiramente positivos, 4 indivíduos falso-negativos, 31 verdadeiramente negativos e 8 falso-positivos. Com as amostras de soro na diluição 1:100, foram detectados 12 indivíduos verdadeiramente positivos, 5 indivíduos falso-negativos, 32 verdadeiramente negativos e 7 falso-positivos.

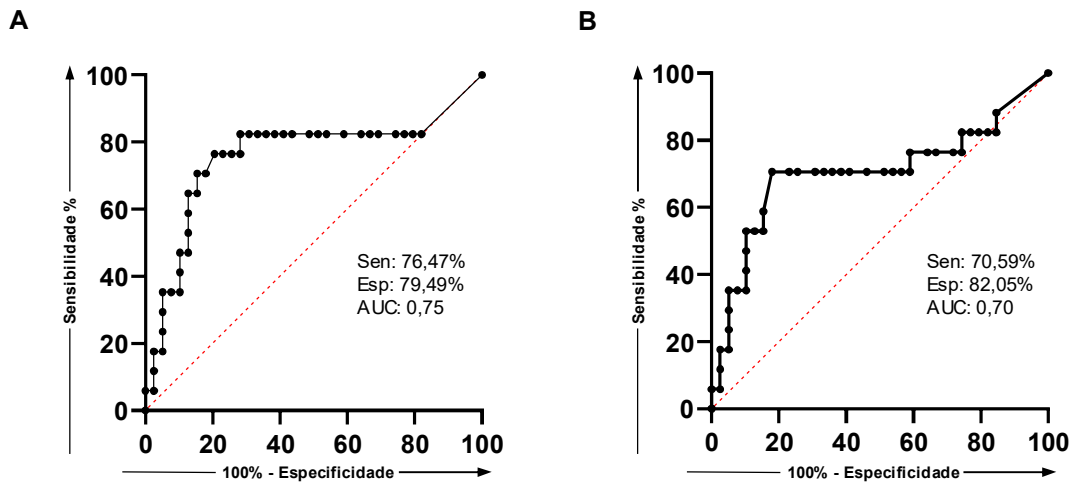
A tabela 4 resume o desempenho dos dois testes. Como observado, o desempenho do teste com as amostras de soro diluídas 1:80 e 1:100 foram semelhantes. Entretanto, o teste com as amostras diluídas 1:80 apresentou maior sensibilidade.

**Figura 23 - Análise da reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por ELISA.**



A reatividade das amostras de soro dos grupos HD (n=19), NE (n=20) e INF (n=17) diluídas 1:80 (A) e 1:100 (B) foi representada pela absorbância a 450nm (OD 450nm). O anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG4 humana conjugado à biotina (SIGMA) foi utilizado na diluição 1:20.000 e a estreptavidina-HRP (BD Pharmigen) na diluição 1:4.000. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA) utilizando o teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Brown-Forsythe. Posteriormente foi aplicado o teste de Mann-Whitney para análise par a par dos dados não paramétricos, com nível de confiança de 98%. A diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,02$ ) está representada nos gráficos pelos asteriscos. O valor dos pontos de corte está indicado pelas linhas pontilhadas e a mediana dos valores de absorbância está representada por um traço. Fonte: a autora.

**Figura 24 - Curvas ROC dos testes de reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante nos ensaios de ELISA.**



As curvas ROC foram construídas a partir da representação gráfica da sensibilidade *versus* o complemento da especificidade dos testes com as diluições de soro 1:80 (A) e 1:100 (B). Para o cálculo da especificidade, os grupos HD e NE foram considerados não infectados. Os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva (AUC) estão mostrados na figura. Fonte: a autora.

**Tabela 3 – Resultado do teste de diagnóstico sorológico utilizando a proteína PPE recombinante em ensaios de ELISA para detecção da imunoglobulina IgG4**

Esquistossomose			
IgG4 (1:80)	INFECTADO	NÃO INFECTADO*	Total
POSITIVO	13 (VP)	8 (FP)	21
NEGATIVO	4 (FN)	31 (VN)	35
Total	17	39	56

IgG4 (1:100)	INFECTADO	NÃO INFECTADO*	Total
POSITIVO	12 (VP)	7 (FP)	19
NEGATIVO	5 (FN)	32 (VN)	37
Total	17	39	56

VP: Verdadeiro positivo; VN: Verdadeiro negativo; FP: Falso positivo; FN: falso negativo.

\* Não infectado = HD + NE. Fonte: a autora.

**Tabela 4 – Desempenho dos testes de diagnóstico sorológico por ELISA utilizando a proteína PPE recombinante e imunoglobulina IgG4**

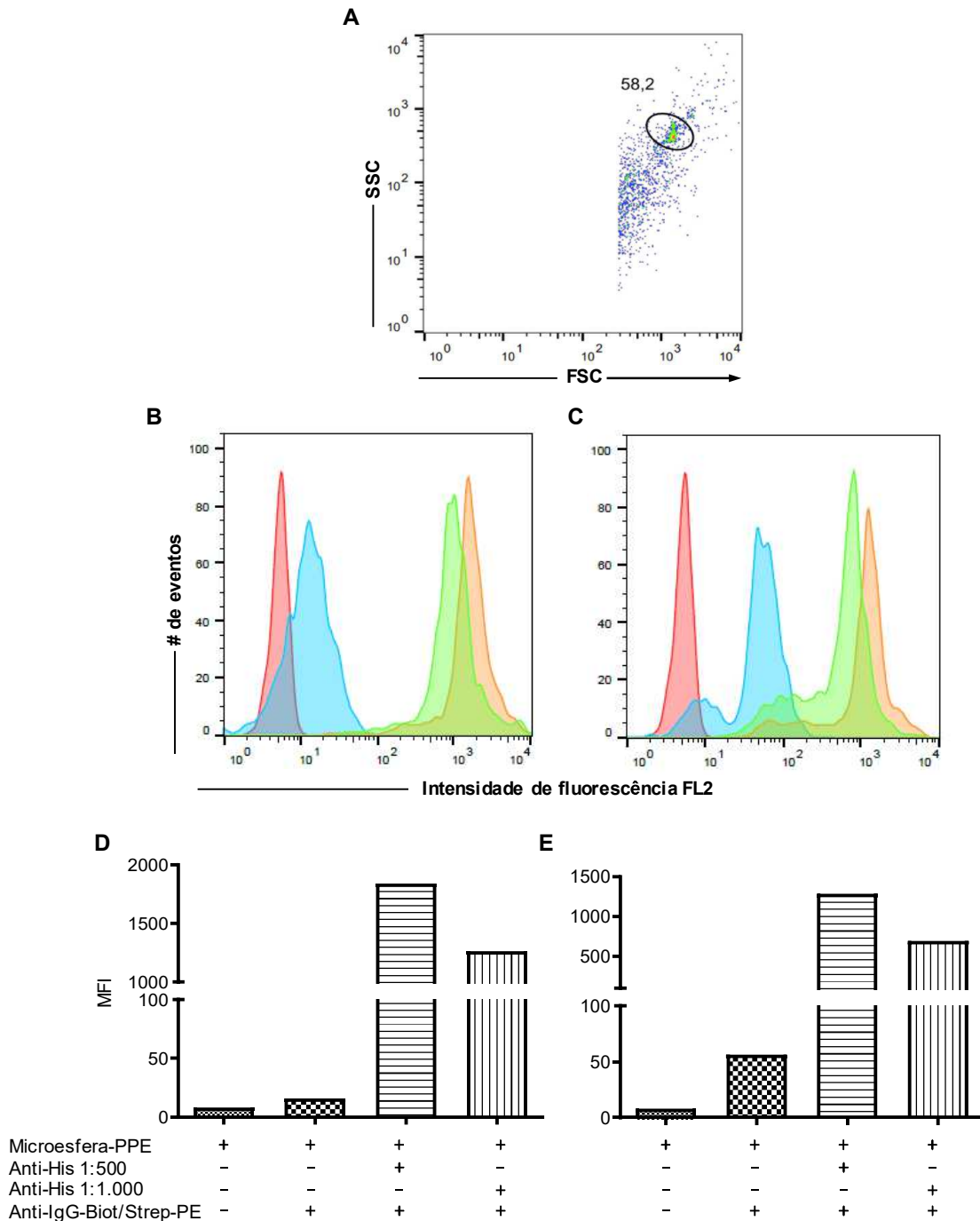
<b>Teste</b>	<b>Sensibilidade (IC 95%)</b>	<b>Especificidade (IC 95%)</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>Acurácia</b>	<b>Kappa (<math>\kappa</math>) (IC 95%)</b>
<b>IgG4 (1:80)</b>	76,47% (52,74-90,44)	79,49% (64,47-89,22)	62%	88%	79%	0,53 (0,29-0,75)
<b>IgG4 (1:100)</b>	70,59% (46,87-86,72)	82,05% (67,33-91,02)	63%	86%	78%	0,51 (0,27-0,75)

IC: Intervalo de confiança; VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo. Fonte: a autora.

### **5.11 Confirmação da estratégia de acoplamento da PPE recombinante a microesferas funcionais**

Para confirmar o acoplamento da proteína PPE às microesferas recombinantes foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-histidina, uma vez que a proteína possui uma cauda de 6xHIS na sua porção C-terminal, e um anticorpo secundário conjugado à biotina, revelado por estreptavidina-PE. A análise da reatividade dos anticorpos foi feita primeiramente pela seleção da população da respectiva microesfera em gráfico bidimensional de densidade de tamanho *versus* granulosidade (FSC X SSC) (Figura 25A). Para avaliar a intensidade média de fluorescência (MFI) da população de microesferas selecionadas, histogramas de fluorescência FL2 foram construídos em função do número de microesferas (Figuras 25B e 25C). Os histogramas em vermelho representam os valores de MFI das microesferas acopladas com PPE e os histogramas em azul, das microesferas acopladas com PPE e incubadas apenas com o anticorpo anti-IgG biotilado nas diluições 1:1.000 (B) e 1:5000 (C). Os valores de MFI referentes às microesferas acopladas com PPE e incubadas com o anticorpo anti-histidina nas diluições 1:500 e 1:1000, e com o anticorpo anti-IgG biotilado nas diluições 1:1.000 (B) e 1:5000 (C) estão representados nos histogramas em laranja e verde, respectivamente. As figuras 25D e 25E mostram a intensidade média de fluorescência (MFI) obtida nas diferentes condições avaliadas em forma de gráficos de barra e demonstram a eficiência da etapa de acoplamento da proteína às microesferas funcionais. A eficiência do acoplamento às microesferas foi avaliada com diferentes lotes de purificação da PPE recombinante, sendo obtidos resultados semelhantes ao mostrado.

**Figura 25 – Confirmação do acoplamento da proteína PPE recombinante às microesferas funcionais.**



(A) Seleção da população de microesferas E7 utilizando os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Sobreposição dos histogramas de FL2 obtidos nas seguintes condições: (B e C) histogramas de fluorescência em FL2 das microesferas acopladas com PPE (vermelho); das microesferas acopladas a PPE e incubadas com anticorpo anti-IgG biotilado (azul) nas diluições 1:1.000 (B) e 1:5.000 (C) e estreptavidina-PE 1:400 (BD Pharmigen™); das microesferas acopladas com PPE incubadas com o anticorpo anti-histidina nas diluições 1:500 (laranja) e 1:1.000 (verde) e com o anticorpo anti-IgG biotilado nas diluições 1:1.000 (B) e 1:5.000 (C), e estreptavidina-PE 1:400 (BD Pharmigen™). Representação da intensidade média de fluorescência (MFI) obtida utilizando anti-IgG biotilado nas diluições 1:1.000 (D) e 1:5.000 (E). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de

fluxo FACScalibur (BD Biosciences™) e as análises realizadas com os softwares *FlowJo 10.0.8* (Tree Star, Ashland) e *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA). Fonte: a autora.

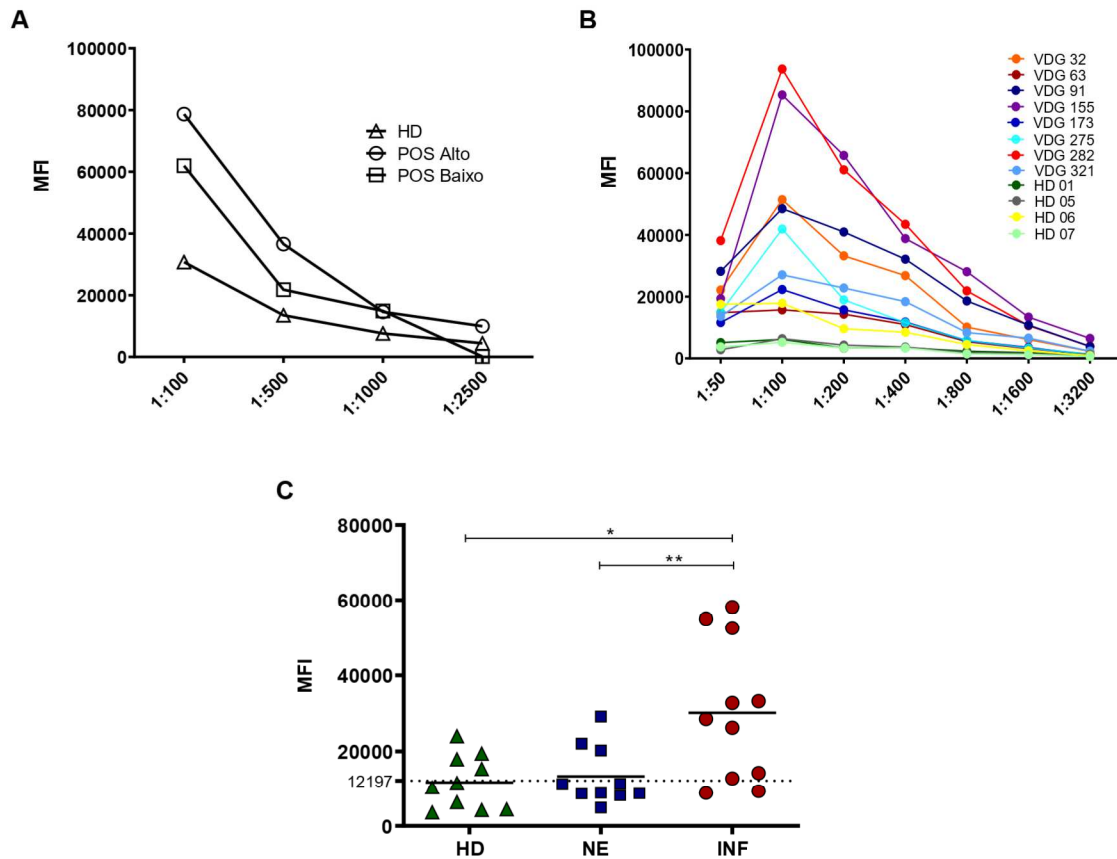
### 5.12 Ensaio de citometria de fluxo com soro humano

Após a confirmação da eficiência da etapa de acoplamento da proteína PPE recombinante às microesferas funcionais, foram realizados os ensaios com amostras de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados de área endêmica para esquistossomose (NE), e de indivíduos doadores saudáveis (HD) de área não endêmica, para avaliar a reatividade de cada amostra à proteína recombinante por meio de ensaios de citometria de fluxo. Nestes ensaios foi avaliada a reatividade das imunoglobulinas IgG (Figura 26) e da subclasse IgG4 (Figura 27), e da imunoglobulina IgA (Figura 28), contra o antígeno PPE acoplado às microesferas funcionais. A título de padronização dos ensaios, para cada imunoglobulina avaliada foram utilizados os *pools* de amostras de soro previamente classificadas como POS Alto e POS Baixo, além do *pool* de amostras de soro de indivíduos doadores saudáveis (HD).

Para os ensaios de reatividade de IgGs, foi realizada uma curva de titulação utilizando os *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD nas diluições 1:100, 1:500, 1:1.000 e 1:2.500 e o anticorpo anti-IgG conjugado a biotina diluído 1:1.000 (Figura 26A) e 1:2.000 (resultado não mostrado). Da mesma forma, algumas amostras de soro que compunham os *pools* POS Alto (VDG 32, 155 e 282), POS Baixo (VDG 63, 91, 173, 275, 321) e HD (01, 05, 06, 07) foram utilizadas individualmente em um ensaio de titulação com diluição seriada do soro (1:50 – 1:3.200) e com o anticorpo anti-IgG conjugado a biotina diluído 1:1.000 (Figura 26B).

Uma vez estabelecidas as melhores condições do ensaio de reatividade de IgGs, as quais foram: diluição do soro 1:200 e do anticorpo anti-IgG 1:1.000, foi realizado um ensaio com todas as amostras de soro disponíveis para este estudo, sendo elas pertencentes a indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (INF; n=11) e não infectados de área endêmica para esquistossomose (NE; n=10), e de indivíduos doadores saudáveis (HD; n=10) de área não endêmica. Como mostrado na figura 26C, os valores de intensidade média de fluorescência obtidos para as amostras de soro INF foram significativamente mais altos do que os observados para as amostras NE ( $P=0,0079$ ) e HD ( $P=0,0127$ ). O ponto de corte foi calculado de acordo com os índices de sensibilidade e especificidade obtidos a partir da construção de uma curva ROC, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados. O ponto de corte deste teste foi 12.197 de MFI. A partir da curva ROC foi determinado o desempenho do teste que apresentou sensibilidade de 81,82% (IC 95% 52,30-96,77%), especificidade de 65% (IC 95% 43,29-81,88) e área sob a curva (AUC) 0,83 (IC 95% 0,673-0,982) (Figura 29A e Tabela 6).

**Figura 26 - Padronização e análise da reatividade de IgG total contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por citometria de fluxo.**



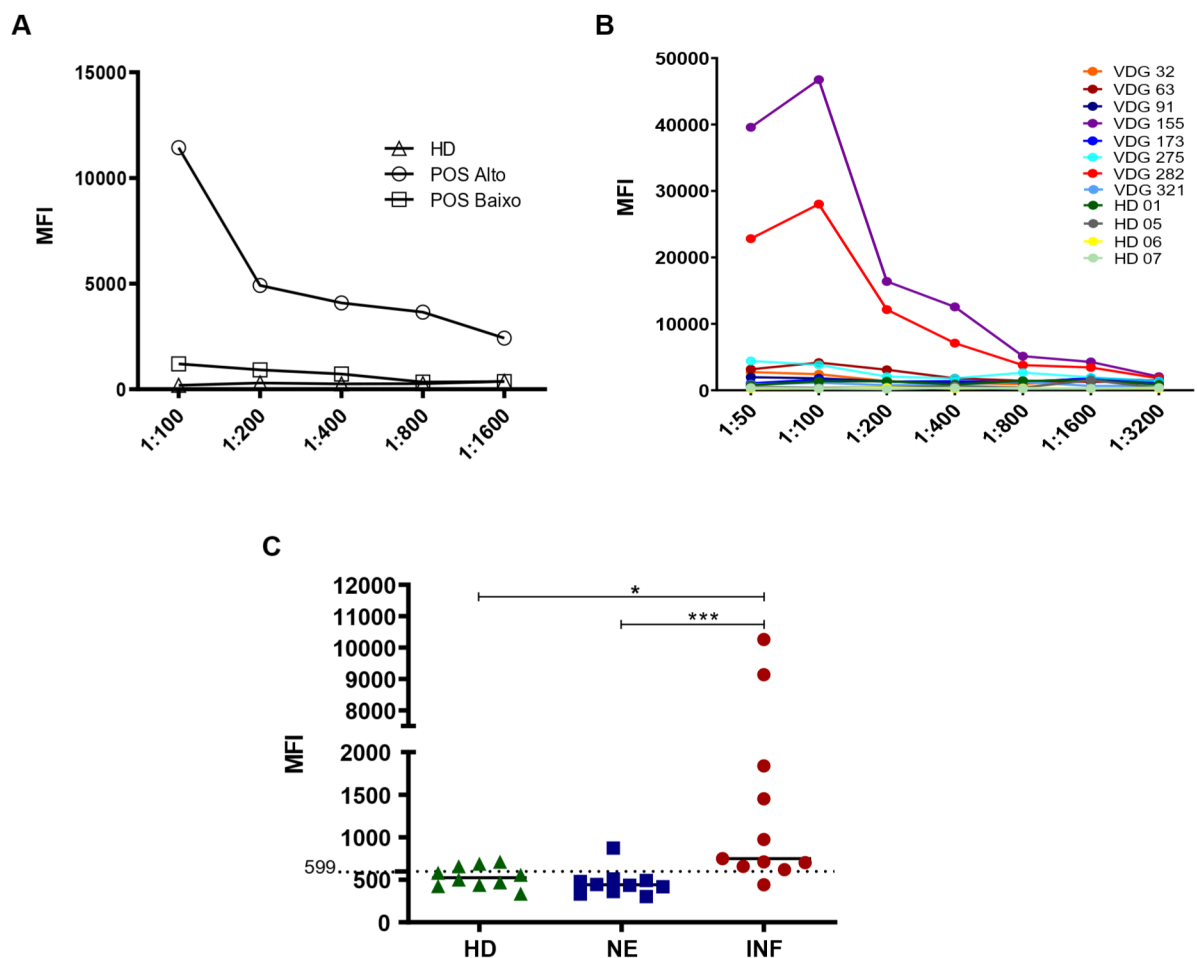
Os valores do eixo *y* dos gráficos representam a intensidade média de fluorescência obtida nos ensaios (MFI). (A) Curvas de titulação da reatividade dos *pools* de amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo utilizando as diluições 1:100, 1:500, 1:1.000 e 1:2.500. (B) Curvas de titulação de amostras de soro individuais representativas dos *pools* HD, POS Alto e POS Baixo utilizando diluição seriada (1:50-1:3.200). (C) Reatividade das amostras de soro individuais dos grupos HD (n=10), NE (n=10) e INF (n=11) diluídas 1:200. O valor do ponto de corte está indicado pela linha pontilhada e a mediana dos valores de absorbância está representada por um traço. Em todos os ensaios o anticorpo anti-IgG conjugado à biotina (Invitrogen) foi utilizado na diluição 1:1000 e a estreptavidina-PE (BD Pharmingen™) na diluição 1:400. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA) utilizando o teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Brown-Forsythe. Posteriormente foi aplicado o Mann-Whitney para análise par a par dos dados não paramétricos, com nível de confiança de 98%. A diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,02$ ) está representada em C pelos asteriscos. Fonte: a autora.

Para os ensaios de reatividade da subclasse de imunoglobulinas IgG4, foi realizada uma curva de titulação com diluição seriada (1:100 – 1:1.600) dos *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD e o anticorpo anti-IgG4 conjugado a biotina diluído 1:500 (Figura 27A), 1:1.000 e 1:2.000 (resultados não mostrados). Algumas amostras de soro que compunham os *pools* POS Alto (VDG 32, 155 e 282), POS Baixo (VDG 63, 91, 173, 275, 321) e HD (01, 05, 06, 07)

foram utilizadas individualmente em um ensaio de titulação com diluição seriada do soro (1:50 – 1:3.200) e com o anticorpo anti-IgG4 conjugado a biotina diluído 1:1000 (Figura 27B).

Uma vez estabelecidas as melhores condições do ensaio de reatividade de IgG4, as quais foram: diluição do soro 1:100 e do anticorpo anti-IgG4 1:500, foi realizado um ensaio com todas as amostras de soro humano (INF; n=11, NE; n=10 e HD; n=10). Como mostrado na figura 27C, os valores de intensidade média de fluorescência obtidos para as amostras de soro INF foram significativamente mais altos do que os observados para as amostras NE ( $P=0,0006$ ) e HD ( $P=0,0219$ ). O ponto de corte calculado para este teste foi 599 de MFI, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados. O teste apresentou sensibilidade de 90,91% (IC 95% 62,26-99,53%), especificidade de 80% (IC 95% 58,40-91,93%) e área sob a curva (AUC) 0,90 (IC 95% 0,775-1,000) (Figura 29B e Tabela 6).

**Figura 27- Padronização e análise da reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por citometria de fluxo.**



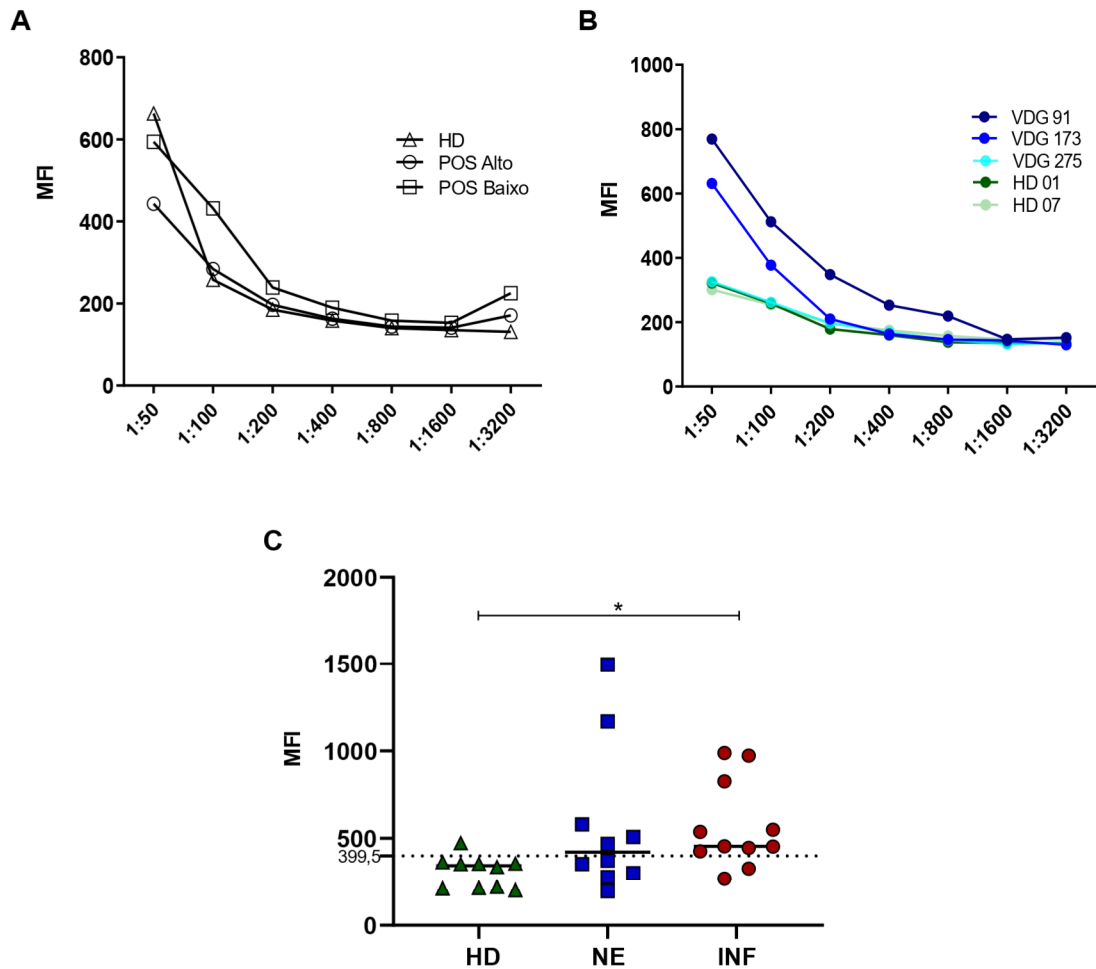


Os valores do eixo *y* dos gráficos representam a intensidade média de fluorescência obtida nos ensaios (MFI). (A) Curvas de titulação da reatividade dos *pools* de amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo utilizando diluição seriada (1:100-1:1.600). (B) Curvas de titulação de amostras de soro individuais representativas dos *pools* HD, POS Alto e POS Baixo utilizando diluição seriada (1:50-1:3.200). (C) Reatividade das amostras de soro individuais dos grupos HD (n=10), NE (n=10) e INF (n=11) diluídas 1:100. O valor do ponto de corte está indicado pela linha pontilhada e a mediana dos valores de absorbância está representada por um traço. Em A e C, o anti-IgG4 conjugado à biotina (SIGMA) foi utilizado na diluição 1:500, e em B, na diluição 1:1000. A estreptavidina-PE (BD Pharmigen™) foi utilizada na diluição 1:400. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA) utilizando o teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Brown-Forsythe. Posteriormente foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, com nível de confiança de 95%. A diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ) está representada em C pelos asteriscos. Fonte: a autora.

Para os ensaios de reatividade da imuglobulina IgA, também foi realizada uma curva de titulação com diluição seriada (1:50 – 1:3.200) dos *pools* de soro POS Alto, POS Baixo e HD e o anticorpo anti-IgA conjugado ao fluorocromo FITC diluído 1:250 (Figura 28A), 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 (resultados não mostrados). Algumas amostras de soro que compunham os *pools* POS Baixo (VDG 91, 173, 275) e HD (01 e 07) foram utilizadas individualmente em um ensaio de titulação com diluição seriada do soro (1:50 – 1:3.200) e com o anticorpo anti-IgA conjugado FITC diluído 1:250 (Figura 28B).

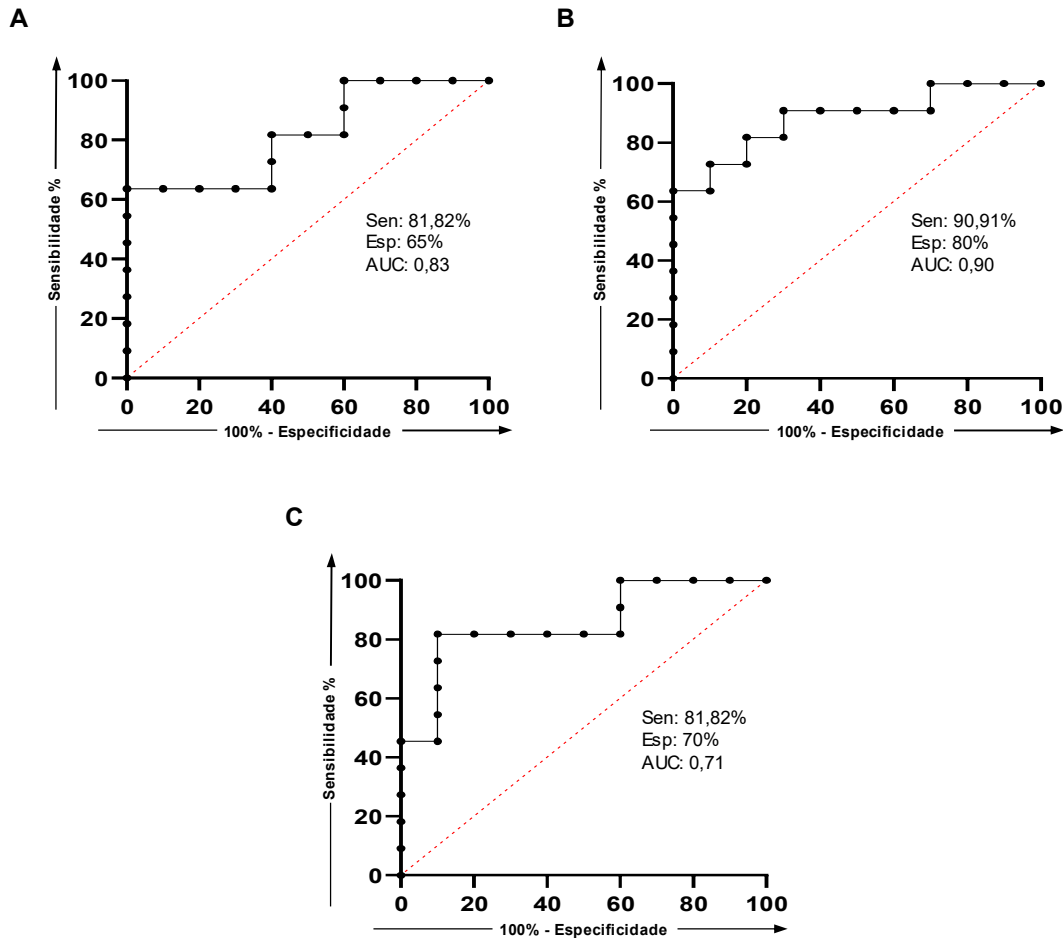
Uma vez estabelecidas as melhores condições do ensaio de reatividade de IgA, as quais foram: diluição do soro 1:100 e do anticorpo anti-IgA 1:250, foi realizado um ensaio com todas as amostras de soro humano (INF; n=11, NE; n=10 e HD; n=10). Como mostrado na figura 28C, o valor de intensidade média de fluorescência obtido para as amostras de soro INF apresentou uma diferença significativa apenas em relação às amostras do grupo HD ( $P=0,02$ ). O ponto de corte calculado para este ensaio a partir da construção da curva ROC, considerando os grupos HD e NE como indivíduos não infectados, foi 399,5 de MFI. Com relação ao desempenho, o teste apresentou sensibilidade de 81,82% (IC 95% 52,30-96,77%), especificidade de 70% (IC 95% 48,10-85,45%) e área sob a curva (AUC) 0,71 (IC 95% 0,520-0,898) (Figura 29C e Tabela 6).

**Figura 28 – Padronização e análise da reatividade de IgA contra a proteína PPE recombinante no ensaio sorológico por citometria de fluxo.**



Os valores do eixo y dos gráficos representam a intensidade média de fluorescência obtida nos ensaios (MFI). (A) Curvas de titulação da reatividade dos *pools* de amostras de soro HD, POS Alto e POS Baixo utilizando diluição seriada (1:50-1:3.200). (B) Curvas de titulação de amostras de soro individuais representativas dos *pools* HD, POS Alto e POS Baixo utilizando diluição seriada (1:50-1:3.200). (C) Reatividade das amostras de soro individuais dos grupos HD (n=10), NE (n=10) e INF (n=11) diluídas 1:100. O valor do ponto de corte está indicado pela linha pontilhada e a mediana dos valores de absorbância está representada por um traço. Em todos os ensaios o anticorpo anti-IgA conjugado ao fluorocromo FITC (SIGMA) foi utilizado na diluição 1:250. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, Ca, USA) utilizando o teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Brown-Forsythe. Posteriormente foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, com nível de confiança de 95%. A diferença significativa entre os grupos HD e INF ( $P < 0,05$ ) está representada em C pelo asterico. Fonte: a autora.

Figura 29 - Curvas ROC dos testes de reatividade de IgG, IgG4 e IgA contra a proteína PPE recombinante nos ensaios de citometria de fluxo.



As curvas ROC foram construídas a partir da representação gráfica da sensibilidade *versus* o complemento da especificidade dos testes com IgG (A), IgG4 (B) e IgA (C). Para o cálculo da especificidade, os grupos HD e NE foram considerados não infectados. Os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva (AUC) estão mostrados na figura. Fonte: a autora.

A tabela 5 mostra o resultado do teste de diagnóstico sorológico com a proteína PPE recombinante nos ensaios de citometria de fluxo utilizando as amostras de soro de indivíduos infectados (INF) e não infectados (NE + HD) e as diferentes imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA. Ao avaliar a reatividade de IgG, foram detectados 9 indivíduos verdadeiramente positivos, 2 indivíduos falso-negativos, 13 verdadeiramente negativos e 7 falso-positivos. Para a reatividade de IgG4, foram detectados 10 indivíduos verdadeiramente positivos, 1 indivíduo falso-negativo, 16 verdadeiramente negativos e 4 falso-positivos. Já para IgA, foram detectados 9 indivíduos verdadeiramente positivos, 2 indivíduos falso-negativos, 14 verdadeiramente negativos e 6 falso-positivos.

A tabela 6 resume o desempenho de cada teste. Como observado, em todos os parâmetros avaliados, o desempenho do teste que avalia a reatividade de IgG4 foi superior aos testes com IgG e IgA.

**Tabela 5 – Resultado do teste de diagnóstico sorológico utilizando a proteína PPE recombinante em ensaios de citometria de fluxo para detecção das diferentes imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA**

<b>Esquistossomose</b>			
<b>IgG</b>	<b>INFECTADO</b>	<b>NÃO INFECTADO*</b>	<b>Total</b>
POSITIVO	9 (VP)	7 (FP)	16
NEGATIVO	2 (FN)	13 (VN)	15
Total	11	20	31

<b>IgG4</b>	<b>INFECTADO</b>	<b>NÃO INFECTADO*</b>	<b>Total</b>
POSITIVO	10 (VP)	4 (FP)	14
NEGATIVO	1 (FN)	16 (VN)	17
Total	11	20	31

<b>IgA</b>	<b>INFECTADO</b>	<b>NÃO INFECTADO*</b>	<b>Total</b>
POSITIVO	9 (VP)	6 (FP)	15
NEGATIVO	2 (FN)	14 (VN)	16
Total	11	20	31

VP: Verdadeiro positivo; VN: Verdadeiro negativo; FP: Falso positivo; FN: falso negativo.

\* Não infectado = HD + NE. Fonte: a autora.

**Tabela 6 – Desempenho dos testes de diagnóstico sorológico por citometria de fluxo utilizando a proteína PPE recombinante e imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA**

<b>Teste</b>	<b>Sensibilidade (IC 95%)</b>	<b>Especificidade (IC 95%)</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>Acurácia</b>	<b>Kappa (<math>\kappa</math>) (IC 95%)</b>
<b>IgG</b>	81,82% (52,3-96,77)	65% (43,29-81,88)	56%	86%	71%	0,42 (0,12-0,72)
<b>IgG4</b>	90,91% (62,26-99,53)	80% (58,40-91,93)	71%	94%	83%	0,67 (0,41-0,93)
<b>IgA</b>	81,82% (52,3-96,77)	70% (48,1-85,45)	60%	87%	74%	0,48 (0,18-0,78)

IC: Intervalo de confiança; VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo. Fonte: a autora.

## 6 DISCUSSÃO

A esquistossomose ainda se destaca como um grave problema de saúde pública no mundo, apesar da redução das taxas de morbimortalidade e prevalência devido às ações dos programas de controle, incluindo saneamento básico e tratamento em massa da população em risco de infecção. Em 2012, na Assembleia Mundial da Saúde, a OMS estabeleceu metas ambiciosas de controle da morbidade da esquistossomose até 2020 e a sua eliminação como problema de saúde pública até 2025, em todos os países onde a doença é endêmica (resolução WHA 65-21), sendo o Brasil um dos países signatários desta resolução (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2014). Um estudo realizado por Deol e colaboradores (2019) sugere a necessidade de reavaliação mais frequente do progresso e das estratégias de controle baseadas na quimioterapia com Praziquantel para que esta meta seja atingida. Além disso, com a iminência do prazo, torna-se fundamental desenvolver novas drogas anti-*Schistosoma* e ferramentas de diagnóstico mais eficazes capazes de ajudar não só para o cumprimento da meta, como também para certificar que a mesma foi alcançada.

Com a finalidade de propor alternativas mais eficazes para o diagnóstico da esquistossomose, o presente trabalho avaliou duas técnicas sorológicas baseadas em um antígeno recombinante de *S. mansoni*. Atualmente, uma importante limitação para o controle da doença é a baixa sensibilidade do teste de diagnóstico que tem sido utilizado por décadas para detecção de ovos nas fezes do hospedeiro, conhecido como Kato-Katz. Esta técnica é utilizada principalmente para a realização de inquéritos coproscópicos e levantamentos epidemiológicos para avaliação da prevalência da esquistossomose (KATZ, 2018). Entretanto, já foi demonstrado, em diferentes estudos, que o Kato-Katz apresenta falhas na detecção de ovos nos casos de infecções com baixa carga parasitária, com baixos índices de sensibilidade neste cenário (ENK et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2015). Alguns fatores, como a eliminação intermitente de ovos nas fezes ou até mesmo a ausência de eliminação dos ovos nas fezes, podem contribuir para a falha de detecção da infecção, comprometendo, assim, a eficiência das medidas de controle da doença (UTIZINGUER et al., 2001; ENGELS et al., 1996; YU, 1998). Principalmente em áreas de baixa endemicidade, a utilização do Kato-Katz faz com que a real prevalência da doença permaneça subestimada e que os indivíduos não diagnosticados corretamente continuem contribuindo para a manutenção do ciclo do parasito.

Além da técnica de Kato-Katz, existe uma variedade de testes de diagnóstico para a detecção da esquistossomose. Contudo, ainda há a necessidade de desenvolver testes capazes

de detectar, no cenário epidemiológico atual da doença, infecções com baixa carga parasitária, que permitam diferenciar infecções ativas de infecções prévias e que sejam livres de reação cruzada com antígenos de outros parasitos.

Os métodos de imunodiagnóstico baseados na detecção de anticorpos, como ELISA e citometria de fluxo com microesferas funcionais, apresentam uma série de vantagens em relação às demais metodologias de diagnóstico disponíveis, tais como: a possibilidade de serem facilmente automatizados, permitindo a análise de um grande número de amostras simultaneamente, a possibilidade de detectar diferentes classes de imunoglobulinas e por poderem apresentar maior sensibilidade e uma correlação direta com a intensidade de infecção (DOENHOFF et al., 1993). Alguns métodos imunológicos têm sido propostos para o diagnóstico da esquistossomose, sendo o método de ELISA o mais utilizado atualmente por apresentar um bom custo-benefício e por auxiliar nos inquéritos para confirmação de casos (HINZ et al., 2017). Tem sido demonstrado que os testes baseados em ensaios de ELISA aumentam a acurácia do diagnóstico da esquistossomose, especialmente em áreas de baixa endemicidade (NOYA et al., 1992; KINKEL et al., 2012; SMITH et al., 2012; ESPÍRITO-SANTO et al., 2014).

As técnicas de diagnóstico sorológico da esquistossomose atualmente existentes variam em relação aos níveis de sensibilidade e especificidade devido à composição dos antígenos utilizados. Estes antígenos podem ser antígenos brutos de diferentes fases do ciclo de vida do parasito, como antígenos solúveis de ovos (SEA) e de cercárias (SMITH et al., 2012), e antígenos de vermes adultos (ESPÍRITO-SANTO et al., 2014). Diversos estudos já demonstraram resultados promissores obtidos com SEA em ensaios de ELISA, obtendo níveis variados de sensibilidade e especificidade (BECK et al., 2004; TURNER et al., 2004; SARHAN et al., 2014). Os antígenos do ovo do parasito são utilizados em um kit comercial de diagnóstico para esquistossomose para detecção de IgG da empresa alemã EUROIMMUN. De acordo com o manual do fabricante, quando são utilizadas amostras de soro de indivíduos não infectados da Europa e de infectados África do Sul, previamente caracterizadas por dois kits de ELISA comerciais, este kit apresenta valores de sensibilidade que variam de 72,7% a 93,2% e de especificidade de 79,4 a 97,8%.

Entretanto, uma vez que o uso de antígenos brutos aumenta a possibilidade de reatividade cruzada com antígenos de outros helmintos, antígenos purificados ou antígenos recombinantes têm sido utilizados na tentativa de melhorar o desempenho dos testes sorológicos para o diagnóstico da esquistossomose. Estudos de McLAREN e colaboradores

(1981) demonstraram que o uso de frações purificadas de antígenos de ovo de *S. mansoni* aumentou o desempenho de ensaios de ELISA, resultando em um teste com 98,9% de sensibilidade e 92,5% de especificidade, quando utilizadas amostras de soro infectadas com *S. haematobium* ou *S. japonicum*. Este trabalho sugere que a seleção de antígenos é uma etapa fundamental para aumentar os índices de especificidade e sensibilidade de um teste sorológico para esquistossomose.

O sequenciamento de genomas e transcriptomas das principais espécies de *Schistosoma* tem impulsionado a busca por novos alvos para o diagnóstico da esquistossomose (BERRIMAN et al., 2009; PROTÁSSIO et al., 2012). Análises *in silico* utilizando os dados do genoma do *S. mansoni* permitiram a identificação de seis proteínas imunogênicas candidatas para o diagnóstico da doença (CARVALHO et al., 2011). Também por ferramentas de bioinformática, o mesmo grupo identificou sete peptídeos que foram testados em ensaios de ELISA. Dentre os peptídeos identificados, um deles apresentou alta capacidade de discriminar infecção ativa de exposição prévia (CARVALHO et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa realizou o primeiro estudo de imunoproteômica com o parasito *S. mansoni* utilizando amostras de soro humano, incluindo soro de indivíduos de área endêmica resistentes e suscetíveis à infecção, permitindo assim uma triagem mais racional para a descoberta de novos antígenos, seja para o desenvolvimento de uma vacina ou para uso como biomarcadores de infecção em um teste de diagnóstico da esquistossomose (LUDOLF et al., 2014). Neste trabalho, foram identificadas 47 diferentes proteínas antigênicas. Dentre as proteínas identificadas, a proteína PPE foi reconhecida exclusivamente pelo soro de indivíduos infectados em experimentos de *western blotting* bidimensional, mas não pelo soro de indivíduos não infectados, tanto de área endêmica quanto de área não endêmica para esquistossomose.

Em um dos primeiros estudos descritos na literatura sobre a proteína PPE, então denominada de p40, Nene e colaboradores (1986) demonstraram que ela é uma proteína fortemente expressa nos estágios de ovo e miracídio, mas que também é expressa em cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. Além disso, comparando o proteoma de diferentes estágios do ciclo de vida do *S. mansoni*, Curwen e colaboradores (2004) mostraram que esta proteína é uma das 40 proteínas mais expressas em extrato solúvel de ovo (SEA). Com relação a sua imunoreatividade, Cordingley e colaboradores (1983) mostraram que a mesma proteína foi reconhecida por soro de coelho imunizado com antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni*, por soro de camundongos infectados e por soro de pacientes infectados, sugerindo, assim, seu uso em testes de imunodiagnóstico da esquistossomose.

No presente trabalho, a sequência correspondente à região codificadora do gene da PPE foi obtida a partir de RNA total extraído de esquistossômulos de *S. mansoni*, corroborando com os dados de Nene e colaboradores (1986) que mostraram a expressão da proteína nas formas mais jovens do parasito presente no hospedeiro definitivo. Esta é uma das vantagens do uso da PPE como antígeno em um ensaio de diagnóstico, permitindo a detecção da infecção tão logo os anticorpos sejam produzidos. Como mostrado por Beck e colaboradores (2008), as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM podem ser detectadas ainda na fase aguda da esquistossomose.

A comparação da sequência de aminoácidos da PPE de *S. mansoni* com a de outras espécies mostrou uma maior similaridade com as principais espécies que infectam o homem, *S. japonicum*, *S. haematobium*, em relação à sequência de *S. bovis*, espécie causadora da esquistossomose em ruminantes. Desta forma, uma futura análise de predição de epítomos de células B poderá indicar epítomos compartilhados entre estas espécies que poderão ser utilizados em testes de diagnóstico da esquistossomose causada também por outras espécies que parasitam o homem. Esta reatividade cruzada contra antígenos de outras espécies de *Schistosoma* já foi demonstrada por Cordingley e colaboradores (1983), que observaram que soro de indivíduos infectados com *S. haematobium* reconhece uma proteína homóloga do *S. mansoni* em ensaios de imunoprecipitação. Além disso, Nene e colaboradores (1986) também mostraram que soro de coelho imunizado com a p40 recombinante reconheceu a proteína homóloga em extrato proteico de ovos de *S. haematobium*, *S. japonicum* e de *S. bovis*.

As análises realizadas neste trabalho de similaridade de sequência da PPE de *S. mansoni* com as proteínas ortólogas de outros geo-helminhos mostraram baixos níveis de similaridade entre elas. Além disso, entre as sequências de PPE de *S. mansoni* e a sequência ortóloga de *A. lumbricoides* não foi observada similaridade. Este resultado sugere um baixo potencial de reatividade cruzada com o uso da PPE como antígeno em um ensaio de diagnóstico sorológico para esquistossomose. No entanto, novos ensaios de ELISA deverão ser posteriormente realizados utilizando amostras de soro de indivíduos infectados apenas com outros geo-helminhos para confirmar esta hipótese. Ademais, como desejado para um antígeno a ser utilizado em ensaio de imunodiagnóstico em humanos, a PPE de *S. mansoni* não apresentou similaridade significativa com uma sequência ortóloga encontrada em *H. sapiens*.

No presente trabalho, a obtenção da proteína PPE de *S. mansoni*, na sua forma recombinante, foi realizada em um sistema de expressão em procarioto utilizando o vetor de expressão pET21a. O sistema pET é um sistema desenvolvido para clonagem e expressão eficaz de proteínas recombinantes em bactérias *E. coli*. Os genes alvos são expressos sob o controle



de um forte promotor T7 que favorece uma alta eficiência de expressão de proteínas recombinantes. Bactérias *E. coli* do tipo DE3 permitem a expressão de proteínas que estejam sob o controle de um promotor T7, uma vez que expressam a T7 RNA polimerase sob o controle do promotor lacUV5, induzível por IPTG. A cepa de bactéria utilizada neste trabalho para a expressão da proteína PPE foi a *ArcticExpress (DE3)*. Estas bactérias co-expressam uma chaperonina que auxilia na conformação correta das proteínas recombinantes no momento da indução da sua expressão em temperaturas mais baixas. Esta condição favorece a expressão e a obtenção, com bom rendimento, de proteínas recombinantes na fração solúvel do extrato bacteriano (FERRER et al., 2004). Sendo assim, a *ArcticExpress (DE3)* foi a cepa de escolha neste trabalho, uma vez que para a realização do acoplamento da PPE recombinante às microesferas que foram utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo, é recomendado que a proteína recombinante esteja solubilizada em tampão PBS.

Desse modo, a utilização do sistema de expressão pET21a/*ArcticExpress (DE3)* possibilitou a expressão da proteína PPE recombinante na fração solúvel do extrato bacteriano em um nível satisfatório, sendo mais expressa nesta fração quando comparada à fração de proteínas insolúveis. O protocolo de purificação em condições nativas que foi otimizado para purificar a proteína PPE recombinante, expressa em fusão com a cauda 6xHis, utilizando colunas de afinidade ao níquel, favoreceu a obtenção da proteína em níveis satisfatórios de rendimento e pureza, sendo obtido aproximadamente 1mg a cada 30mL de cultura. O resultado obtido no experimento de *western blotting* com o anticorpo anti-histidina, além de confirmar a massa molecular esperada da proteína recombinante, também comprovou a integridade da proteína obtida, sendo observada apenas uma única banda correspondente à proteína em fusão com 6xHis.

Apesar da diferença de alguns aminoácidos observada entre a sequência traduzida a partir da sequência de DNA consenso, obtida pelo sequenciamento parcial do plasmídeo pET21a-PPE, e a sequência depositada no banco de dados UniProt (G4V8Y7), análises de espectrometria de massas confirmaram, com alto grau de confiança, a identidade da proteína PPE recombinante purificada (resultado não mostrado).

Neste trabalho, as etapas de obtenção da proteína PPE recombinante se mostraram bastante reprodutíveis. O uso de proteínas recombinantes nos ensaios sorológicos facilita a etapa de padronização, por apresentarem menor variação na obtenção dos diferentes lotes de antígeno, além de aumentar a segurança e a reprodutibilidade dos ensaios. Como foi observado na avaliação de estabilidade, a proteína PPE recombinante mostrou ser estável em diferentes

temperaturas, por no mínimo sete dias. Desta forma, a PPE recombinante apresenta características desejáveis para compor um *kit* de diagnóstico da esquistossomose. A estabilidade da proteína é uma característica que facilitaria o transporte deste *kit* e favoreceria a sua incorporação em plataformas *point of care*. Entretanto, a manutenção da reatividade do soro de indivíduos infectados contra a proteína recombinante mantida em diferentes temperaturas deverá ser avaliada em ensaios futuros. Outra vantagem da obtenção de um antígeno recombinante, em relação ao uso de antígenos brutos, é não necessitar da manutenção do ciclo do parasito e o processamento de parasitos vivos. Além disso, os antígenos recombinantes podem ser produzidos em larga escala (CARVALHO et al., 2014; MAKAROVA et al., 2003).

Por meio do ensaio de *western blotting* utilizando *pools* de amostras de soro de indivíduos, infectados ou não pelo *S. mansoni*, foi demonstrado que a proteína PPE recombinante manteve o mesmo perfil de reconhecimento observado nos ensaios de *western blotting* bidimensional anteriormente realizados com a proteína nativa (LUDOLF et al., 2014), sendo a proteína recombinante fortemente reconhecida por anticorpos presentes nas amostras de soro de indivíduos infectados, mas não pelas amostras de soro de indivíduos não infectados de área endêmica e de área não endêmica para esquistossomose. Além disso, como também mostrado por Ludolf e colaboradores (2014), a mesma proteína que foi expressa *in vitro* em sistema livre de células, utilizando extrato de germe de trigo, foi reconhecida apenas pelo soro de indivíduos infectados.

Em nosso trabalho a reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA em soro de indivíduos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* contra a proteína PPE recombinante foi avaliada em duas plataformas de ensaios sorológicos. Alguns estudos demonstraram que diferentes isotipos e subclasses de imunoglobulinas podem aumentar a precisão na detecção da infecção por *S. mansoni* (FUKUSHIGE et al., 2019; MUTAPI et al., 2011). A maioria dos testes comerciais de diagnóstico da esquistossomose existentes e os trabalhos descritos na literatura são baseados na detecção de IgG total, que é altamente produzida durante a infecção por *S. mansoni* (HINZ et al., 2017). Além disso, as subclasses IgG1 e IgG4, e os isotipos IgA e IgE demonstraram diferenças quantitativas e qualitativas no perfil de reconhecimento de antígenos de *S. haematobium* (MUTAPI et al., 2011). Elevados níveis de IgA contra antígenos de ovo, secções de granulomas do fígado e do tubo digestivo de vermes adultos foram encontrados principalmente em indivíduos com infecção aguda (KANAMURA et al., 1979, 1991; EVENGARD et al., 1990; RABELLO et al., 1995). Um estudo sobre a avidéz dos anticorpos

IgA, IgM, IgG e subclasses de IgG com antígenos solúveis de ovo demonstrou que existe uma baixa avidéz de ligação dos anticorpos IgG, IgG1, IgG3 e IgA na fase aguda da esquistossomose. No entanto, IgG1 apresentou uma avidéz elevada em infecções crônicas (GOUVÊA, RABELLO, KATZ, 2001). A presença de níveis elevados de IgG4 foi associada com infecções antes do tratamento, reinfeções após o tratamento ou susceptibilidade à infecção (MATOSO et al., 2013; COLLEY, 2014). Sendo assim, optamos por realizar ensaios com as imunoglobulinas IgG total, IgG4 e IgA por estarem diretamente associadas à diferentes fases da doença.

Após finalizar os ensaios para padronização de um teste de ELISA utilizando a proteína PPE recombinante como antígeno, a reatividade de IgG foi avaliada utilizando as amostras de soro individuais diluídas 1:40, 1:80 e 1:100. Nestes três ensaios foi possível discriminar os indivíduos infectados dos indivíduos não infectados, tanto de área endêmica quanto de área não endêmica para esquistossomose. O teste utilizando as amostras de soro diluídas 1:100 apresentou o melhor desempenho dentre os três testes de ELISA realizados, sendo obtidos os maiores valores de sensibilidade (88,89%), especificidade (74,36%) e acurácia global (AUC = 0,86). Nesta condição, também foram obtidos os maiores valores de VPP (62%), VPN (94%) e acurácia (79%). O índice Kappa calculado foi de 0,56 que, de acordo com Landis & Kock (1977), representa uma moderada concordância entre os testes. Vale ressaltar que para determinar o desempenho de todos os testes realizados neste trabalho, as amostras dos grupos de indivíduos doadores saudáveis (HD) e indivíduos não infectados de área endêmica (NE) foram consideradas como amostras negativas. Esse critério foi aplicado com o objetivo de desenvolver um teste de diagnóstico para esquistossomose que possa distinguir, dentre os indivíduos de área endêmica, aqueles que são infectados dos que não são.

Já os testes de ELISA realizados para análise de reatividade de IgG4 utilizando as amostras de soro diluídas 1:80 e 1:100 foram capazes de discriminar os indivíduos infectados apenas dos indivíduos saudáveis de área não endêmica. Portanto, este teste não é adequado para utilização em áreas endêmicas para doença, podendo resultar em diagnóstico falso positivo. Independente da diluição do soro utilizada, os testes para detecção de IgG4 PPE-específica apresentaram um desempenho semelhante entre eles, com valores de sensibilidade de 76,47% e 70,59%, especificidade de 79,49% e 82,05%, e acurácia global de 0,75 e 0,70, respectivamente. Foram também determinados os valores de VPP (62% e 63%), VPN (88% e 86%), acurácia (79% e 78%) e índice Kappa (0,53 e 0,51) para a diluição 1:80 e 1:100,

respectivamente. Os índices Kappa observados representam uma moderada concordância entre os testes.

Como observado, os valores de sensibilidade obtidos nos ensaios de reatividade de IgG nos ensaios de ELISA foram maiores quando comparados aos obtidos nos ensaios com IgG4. Por outro lado, os valores de especificidade observados nos ensaios de reatividade de IgG4 foram maiores em relação aos observados para IgG. Porém, no contexto da esquistossomose, principalmente em áreas com baixa prevalência, onde o objetivo das ações de controle é a eliminação da doença, o teste de diagnóstico a ser utilizado deve priorizar a sensibilidade para detecção de casos, em detrimento à especificidade. Da mesma forma, testes que priorizam a sensibilidade devem ser utilizados para avaliação das taxas de cura após o tratamento (WEERAKOON et al., 2015).

Diversos trabalhos têm utilizado proteínas recombinantes de *S. mansoni* em ensaios de ELISA para avaliar o seu potencial no diagnóstico da esquistossomose. Utilizando a proteína recombinante rSm200, foram obtidos níveis de sensibilidade de 90% e especificidade de 93,3%, sendo capaz de diferenciar indivíduos saudáveis de área não endêmica de indivíduos infectados de área endêmica. Porém, nestes ensaios não foi possível discriminar entre os indivíduos infectados e não infectados de área endêmica (CARVALHO et al., 2014). Makarova e colaboradores (2003) mostraram que a proteína RP26 (Sm22.3) foi capaz de diferenciar infecções agudas de infecções crônicas em um ensaio de ELISA. Esta mesma proteína apresentou sensibilidade de 83% e 32% ao avaliar a reatividade de IgG de indivíduos infectados em fase aguda e crônica, respectivamente. Além disso, o uso desta proteína aumentou os níveis de especificidade observados no teste de ELISA contra SEA (MAKAROVA et al., 2005). Ao avaliar a reatividade de IgG contra a proteína recombinante *Major Egg Antigen* de *S. mansoni* em ensaio de ELISA, foram obtidos índices de sensibilidade de 87,10% e de especificidade de 89,09%, considerando como amostras negativas apenas os doadores saudáveis, pois dos 80 indivíduos negativos de área endêmica, 41 foram positivos no ensaio realizado (SILVA-MORAES et al., 2019).

Neste trabalho avaliamos o potencial uso da proteína PPE recombinante no diagnóstico sorológico da esquistossomose também por ensaios de citometria de fluxo com microesferas funcionais. Inicialmente, utilizando um anticorpo anti-histidina, foi demonstrado que a proteína PPE recombinante foi acoplada com sucesso às microesferas funcionais. Nos ensaios seguintes, foram utilizadas amostras de soro de indivíduos infectados e não infectados para avaliar a reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG4 e IgA contra a PPE recombinante. Nos ensaios

realizados para avaliar a reatividade das imunoglobulinas IgG e IgG4 foi possível diferenciar os indivíduos infectados dos indivíduos não infectados, tanto de área endêmica quanto de área não endêmica para esquistossomose. Entretanto, o teste para detecção de IgA não foi capaz de discriminar entre os indivíduos infectados e não infectados de área endêmica. Como elevados níveis de IgA estão relacionados com a fase aguda da doença, a sua reatividade contra a PPE observada em alguns dos indivíduos negativos de área endêmica pode ser explicada pela possibilidade de estarem infectados em uma fase pré-patente, impedindo o diagnóstico correto da infecção baseado na detecção de ovos pelas técnicas de Kato-Katz e PCR (RABELLO et al., 1995).

Dentre os três testes realizados com citometria de fluxo, o que avaliou a reatividade de IgG4 contra a PPE recombinante apresentou os melhores índices de desempenho, com maiores índices de sensibilidade (90,91%), especificidade (80%) e acurácia global (AUC = 0,90), sendo que quanto mais próximo do valor de 1,0, melhor o poder de discriminação do teste (BORGES, 2016). Neste teste também foram obtidos os maiores valores de VPP (71%), VPN (94%) e acurácia (83%). O índice Kappa calculado foi de 0,67, representando uma concordância substancial entre o teste e a condição dos indivíduos doadores das amostras de soro (infectado/não infectado), previamente determinada pelas técnicas de Kato-Katz e PCR. Altos índices de sensibilidade permitirão explorar futuramente o potencial da proteína PPE também no diagnóstico da esquistossomose para controle de cura pós-tratamento.

A literatura descreve a utilização da metodologia de citometria de fluxo para o diagnóstico de algumas doenças parasitárias. Teixeira-Carvalho e colaboradores (2015) utilizaram um ensaio multiplex denominado FC-TRIPLEX para o diagnóstico sorológico diferencial de Doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral, com o qual foram obtidos excelentes resultados, atingindo níveis de sensibilidade de 95% e especificidade de 97% para Doença de Chagas, e 100% de sensibilidade e especificidade para as leishmanioses. Utilizando uma metodologia semelhante, Tanigawa e colaboradores (2015) realizaram um ensaio Luminex-multiplex anti-IgG com o objetivo de desenvolver um teste de diagnóstico da esquistossomose, utilizando dez antígenos de *S. mansoni*. Os melhores resultados foram obtidos com os antígenos SmSERPIN, com valores de 89,4% de sensibilidade e 81,5% de especificidade, e SmRP26 que apresentou níveis de sensibilidade de 67,8% e especificidade de 89,5%.

Diferentes abordagens poderão ser aplicadas utilizando a plataforma de citometria de fluxo para análise da reação antígeno PPE-anticorpo. Por exemplo, empregando um ensaio

multiplex com a proteína PPE e outras proteínas que já foram apontadas como candidatas promissoras para o diagnóstico sorológico da esquistossomose. Além disso, diferentes peptídeos imunogênicos da própria proteína PPE poderão ser incorporados às microesferas funcionais a fim de aumentar a chance de reconhecimento por diferentes classes e subclasses de anticorpos e serem utilizados para discriminar indivíduos infectados e não infectados.

Ao comparar o desempenho entre os testes de ELISA e citometria de fluxo aplicados neste trabalho, dentre os que avaliaram a reatividade de IgG total, o teste de ELISA com as amostras soro diluídas 1:100 apresentou melhor desempenho quando comparado ao teste que avaliou a reatividade de IgG total em citometria de fluxo. Já o teste que avaliou a reatividade de IgG4 contra a proteína PPE recombinante na plataforma de citometria de fluxo apresentou melhor desempenho quando comparado com os resultados obtidos nos testes de ELISA que avaliaram a reatividade de IgG4, tanto com a diluição das amostras de soro 1:80, quanto 1:100. E no geral, o teste de reatividade de IgG4 no ensaio de citometria de fluxo apresentou os melhores índices de desempenho dentre todos os testes avaliados neste trabalho.

Apesar de os testes sorológicos para esquistossomose não substituírem o método parasitológico de Kato-Katz como um único teste, eles podem contribuir para investigação e determinação da real prevalência da esquistossomose em inquéritos epidemiológicos, sendo aplicados como ferramenta de triagem e de controle de cura, principalmente em áreas de baixa transmissão. Na ausência de um teste que seja, ao mesmo tempo, altamente sensível e específico, o uso de diferentes métodos de diagnóstico associados se torna fundamental no cenário epidemiológico atual da doença. Em nosso trabalho, foi possível observar que a proteína PPE recombinante tem o potencial de ser utilizada como antígeno para o diagnóstico da esquistossomose em diferentes plataformas baseadas no método sorológico, como evidenciado pelo bom desempenho obtido nos testes realizados.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram que a proteína PPE recombinante apresenta características de um antígeno promissor para o diagnóstico da esquistossomose. A otimização dos protocolos de expressão em sistema procarioto e de purificação da proteína recombinante permitiu a obtenção da PPE recombinante estável, com rendimento e nível de pureza satisfatórios. Além disso, a PPE recombinante manteve o perfil de reconhecimento antigênico observado para a proteína nativa. Os testes de diagnóstico desenvolvidos neste trabalho, empregando os ensaios sorológicos de ELISA e de citometria de fluxo com o antígeno PPE, apresentaram bons resultados, sendo o teste de reatividade de IgG4 no ensaio de citometria de fluxo o que apresentou os melhores índices de desempenho dentre todos os que foram avaliados. Portanto, a proteína PPE de *S. mansoni* recombinante tem potencial para ser utilizada no diagnóstico preciso da esquistossomose e, conseqüentemente, contribuir para o aperfeiçoamento das estratégias adotadas no controle da doença.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADRIKO, M. et al. Low Praziquantel Treatment Coverage for *Schistosoma mansoni* in Mayuge District, Uganda, Due to the Absence of Treatment Opportunities, Rather Than Systematic Non-Compliance. **Trop Med Infect Dis**, v. 3, n. 4, p. 111-123, 2018. doi: 10.3390/tropicalmed3040111.
- AJUA, A. et al. A flow cytometry-based workflow for detection and quantification of anti-plasmodial antibodies in vaccinated and naturally exposed individuals. **Malaria Journal**, v. 11, n. 367, 2012. doi: 10.1186/1475-2875-11-367.
- ASHTON, P. D.; CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. **Trends Parasitol**, v. 17, n. 4, p. 198-202, 2001. doi: 10.1016/s1471-4922(00)01947-4.
- BARBOSA, F. S.; Morbidade da Esquistossomose. Estudo em Quatro Localidades no Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade do Recife, 1965.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013. doi: 10.1016/j.jare.2013.01.005.
- BECK, L. et al. Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 229-233, 2008. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.08.012.
- BECK, L. et al. Evaluation of tests based on the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, sup. 1, p. 97-98, 2004. doi: 10.1590/s0074-02762004000900017.
- BELL, D. R.; A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces with special reference therapeutical trials. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, n. 4, p. 525-530, 1963.
- BERGGREN, W. L. & WELLER, T. H. Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 16, n. 5, p. 606-612, 1967. doi: 10.4269/ajtmh.1967.16.606.
- BERGQUIST, N. R. Present aspects of immunodiagnosics of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, sup. 4, p. 29-38, 1992. doi: 10.1590/s0074-02761992000800004.
- BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009. doi: 10.1038/nature08160.
- BILHARZ, T. M. Fernere Beobachtungen über das die Pfortader des Menschen bewohnend *Distomum haematobium* und sein Verhältniss zu gewissen pathologischen Bildungen aus brieflichen Mittheilungen an Professor v. Siebold. vom 29. **Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie**, v. 4, p. 72-76, 1852.



BLAGG, W. et al. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helmint eggs in feces. **Am J Trop Med Hyg**, v. 4, n. 1, p. 23-28, 1955. doi: 10.4269/ajtmh.1955.4.23.

BLOCH, E. H. *In vivo* microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine. **Am J Trop Med Hyg**, v. 29, n. 1, p. 62-70, 1980.

BORGES, L. S. R. Medidas de Acurácia Diagnóstica na Pesquisa Cardiovascular. **Int J Cardiovasc Sci**, v. 29, n. 3, p. 218-222, 2016.

BOUT, D.; SANTORO, F.; CAPRON, A. A. Detection des immunocomplexes dans la bilharziose. **Mddicine er M&zdzies Infectieuses**, v. 5, p. 631-636, 1975.

BRASCHI, S. & WILSON, R. A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 347-356, 2006. doi: 10.1074/mcp.M500287-MCP200.

BRASCHI, S. et al. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1471-1482, 2006. doi: 10.1002/pmic.200500368.

BRITO, H. C. D.; ANAI, L. A.; SANTANA, A. E. O uso do ensaio multiplex baseados em bead na medicina veterinária. **Investigação Medicina Veterinária**, v. 15, n. 4, p. 12-18, 2016.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x.

BURLANDY-SOARES, L. C. et al. Schistosomiasis mansoni: follow-up of control program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 853-859, 2003. doi: 10.1590/s0074-02762003000600025.

CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 109-117, 2008. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.027.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 690-692, 2012. doi: 10.1590/s0074-02762012000500019.

CARNEIRO, T. R. et al. A conventional polymerase chain reaction-based method for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low-endemicity area. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 1037-1044, 2013. doi: 10.1590/0074-0276130202.

CARVALHO, G. B. F. et al. Evaluation of the use of C-terminal part of the *Schistosoma mansoni* 200 kDa tegumental protein in schistosomiasis diagnosis and vaccine formulation. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 24-32, 2014. doi: 10.1016/j.exppara.2014.02.003.

- CARVALHO, G. B. F. et al. Selecting targets for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection: An integrative approach using multi-omic and immunoinformatics data. **PLoS One**, v. 12, n. 8, e0182299, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0182299.
- CARVALHO, G. B. F. et al. Identification of *Schistosoma mansoni* candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. **Mem Int Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 837-843, 2011. doi: 10.1590/s0074-02762011000700009.
- CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni*, Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. **Rio de Janeiro: Editora Fiocruz**, 2008.
- CASS, C. L. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Mol Biochem Parasitol**, v. 155, n. 2, p. 84-93, 2007. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.06.002.
- CASTRO-BORGES, W. et al. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, e993, 2011a. doi: 10.1371/journal.pntd.0000993.
- CASTRO-BORGES, W. et al. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1519-1533. 2011b. doi: 10.1016/j.jprot.2011.06.011.
- CAVALCANTI, M. G. et al. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 75-82, 2013. doi: 10.1016/j.pt.2012.11.003.
- CHEEVER, A. W. & ANDRADE, Z. A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 61, n. 5, p. 629-639, 1967. doi: 10.1016/0035-9203(67)90125-3.
- CHEN, Q. et al. Eukaryotic expression of SjE16, SjPPIase and SjRobl genes from *Schistosoma japonicum* egg and evaluation of their role in immunodiagnosis. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 31, n. 3, p.170-175, 2013.
- COELHO, P. M. Z. & CALDEIRA, R. L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brasil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, p. 57, 2016. doi: 10.1186/s40249-016-0153-6
- COELHO, P. M. Z. et al. Use of saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 720-723, 2009. doi: 10.1590/s0074-02762009000500010.
- COLLEY, D. G.; ANDROS, T. S., CAMPBELL Jr, C. H. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2017. doi: 10.1186/s40249-017-0275-5.
- COLLEY, D. G. 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**, v. 88, n. 3, p. 426-432, 2013. doi: 10.4269/ajtmh.12-0639.

- COLLEY, D. G. & SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347-57, 2014. doi: 10.1111/pim.12087.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2
- CORDINGLEY, J. S. et al. Clone banks of cDNA from the parasite *Schistosoma mansoni*: isolation of clones containing a potentially immunodiagnostic antigen gene. **Gene**, v. 26, n. 1, p. 25-39, 1983. doi: 10.1016/0378-1119(83)90033-1.
- COSTA, C. S. et al. Programa de Controle da Esquistossomose: avaliação da implantação em três municípios da Zona da Mata em Pernambuco, Brasil. **SAÚDE DEBATE**, Rio de Janeiro, v. 41, n. especial, p. 229-241, 2017.
- COURA, J. R. & AMARAL R. S.; Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, s. 1, p. 13-19, 2004. doi: 10.1590/s0074-02762004000900003.
- CRELLEN, T. et al. Reduced efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is associated with multiple rounds of mass drug administration. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 9, p.1151–1159, 2016. doi: 10.1093/cid/ciw506. Epub 2016 Jul 28.
- CURWEN, R.S. et al. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. **Mol Biochem Parasitol**, v. 138, n. 1, p. 57- 66, 2004. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.06.016.
- De JONGE, N. et al. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 85, n. 6, p. 756-759, 1991. doi: 10.1016/0035-9203(91)90446-6.
- DEELDER A. M. et al. *Schistosoma mansoni* demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. **Exp Parasitol**, v. 40, n. 2, p. 189-197, 1976. doi: 10.1016/0014-4894(76)90081-3.
- DEELDER, A. M.; DUCHENNE, W.; POLDERMAN, A. M. Serodiagnosis of schistosoma infections. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 133, n. 4, p. 154-156, 1989.
- DEOL, A. K. et al. Schistosomiasis – Assessing Progress toward the 2020 and 2025 Global Goals. **N Engl J Med**, v. 381, n. 26, p. 2519-2528, 2019. doi: 10.1056/NEJMoa1812165.
- DOENHOFF, M. J. et al. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 1, p. 42-48, 1993. doi: 10.1016/0035-9203(93)90415-m.
- DOENHOFF, M. J.; CHIODINI, P. L.; HAMILTON, J. V. Specific and sensitive diagnosis of *Schistosoma* infection: can it be done with antibodies? **Trends Parasitol**, v. 20, n. 1, p. 35- 39, 2004. doi: 10.1016/j.pt.2003.10.019.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 6, p. 659–667, 2008. doi: 10.1097/QCO.0b013e328318978f.

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**, v. 54, n. 4, p. 319–324, 1996. doi: 10.4269/ajtmh.1996.54.319.

ENK, M. J. et al. Rural tourism: a risk for schistosomiasis transmission in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 537-540, 2010. doi: 10.1590/s0074-02762010000400032.

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, 2008a doi: 10.1016/j.actatropica.2008.09.016.

ENK, M. J. et al. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 1, p. 140-146, 2008b.

ESPIRITO-SANTO, M. C. et al. Evaluation of the sensitivity of IgG and IgM ELISA in detecting *Schistosoma mansoni* infections in a low endemicity setting. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 12, p. 2275-2284, 2014. doi: 10.1007/s10096-014-2196-6.

EVENGARD, B. et al. Early antibody responses in human schistosomiasis. **Clin Exp Immunol**, v. 80, n. 1, p. 69-76, 1990. doi: 10.1111/j.1365-2249.1990.tb06443.x.

FAVERO, V. et al. Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 28-34, 2017. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.001.

FERNÁNDEZ-SOTO, P. et al. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, e3126, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003126.

FERNÁNDEZ-SOTO, P. et al. Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **PLoS One**, v. 14, n. 3, e0214125, 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0214125.

FERRER, M. et al. Functional consequences of single:double ring transitions in chaperonins: life in the cold. **Molecular Microbiology**, v.53, n.1, p. 167-182, 2004. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04077.x.

FILLIÉ, Y. E. et al. Evaluation of an ELISA for combined measurement of CAA and CCA in schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 57, n. 4, p. 279-287, 1994. doi: 10.1016/0001-706x(94)90073-6.

FUKUSHIGE, M.; MUTAPI, F.; WOOLHOUSE, M. E. J.; Population level changes in schistosome-specific antibody levels following chemotherapy. **Parasite Immunol**, v. 41, n. 1, e12604, 2019. doi: 10.1111/pim.12604.

- GANDASEGUI, J. et al. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 3, e0006314, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006314.
- GOMES, L. I.; ENK, M. J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2014. doi: 10.1590/0037-8682-0231-2013.
- GOMES, L. I. et al. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 4, e664, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000664.
- GOMES, L. I. et al. Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1194-1196, 2009. doi: 10.1590/s0074-02762009000800021.
- GOUVÊA, L. V.; RABELLO, A.; KATZ, N. Antibody subclass profile and avidity during acute and chronic human *Schistosoma mansoni* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 5, p. 550-556, 2001. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90038-0.
- GRAVES, P. R. & HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002. doi: 10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002.
- GRENFELL, R. F. Q. et al. Innovate methodology for point-of-care circulating cathodic antigen with rapid urine concentration for use in the field for detecting low *Schistosoma mansoni* infection and for control of cure with high accuracy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 112, n. 1, p. 1-7, 2018. doi: 10.1093/trstmh/try014.
- GUEGAN, H. et al. Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 9, e0007711, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007711.
- GUILLOU, F. et al. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 155, n. 1, p. 45-56, 2007. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.05.009.
- HAAS, W. et al. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **J Parasitol**, v. 83, n. 6, p. 1079-1085, 1997.
- HANSELL, E. et al. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 7, e262, 2008. doi: 10.1371/journal.pntd.0000262.
- HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nat Biotechnol**, v. 11, n. 9, p. 1026–1030, 1993. doi: 10.1038/nbt0993-1026.
- HINZ, R. et al. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. **Mol Cell Probes**, v. 31, p. 2-21, 2017. doi: 10.1016/j.mcp.2016.12.003.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-298, 1934.

JIN, Y. M. et al. Comparison of Recombinant Proteins from *Schistosoma japonicum* for Schistosomiasis Diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 3, p. 476-480, 2010. doi: 10.1128/CVI.00418-09.

JURBERG, A. D. et al. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 112-114, 2008. doi: 10.1590/s0074-02762008005000005.

KAGAN, I. G. Hemagglutination after immunization with schistosome antigens. **Science**, v. 122, n. 3165, p. 376-377, 1955. doi: 10.1126/science.122.3165.376.

KANAMURA, H. Y. et al. Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. **Am J Trop Med Hyg**, v. 28, n. 2, p. 242-248, 1979. doi: 10.4269/ajtmh.1979.28.242.

KATO, K. & MIURA, M. Comparative examinations. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 3, p. 35, 1954.

KATSURADA, F. The etiology of a parasitic disease. **Iji Shimibun**, v. 669, p. 1325-1332, 1904.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses. Belo Horizonte, CPqRR, 2018.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thicksmear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KER, H. G. Do leishfhow ao leishplex: Inovações tecnológicas da sorologia por citometria de fluxo aplicada ao diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, 2016.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J.; Reassessment of the cost of chronic helminth infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561-1569, 2005. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66457-4.

KINKEL, H. F. et al. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 6, p. 948-953, 2012. doi: 10.1128/CVI.05680-11.

KNIGHT, W. B. et al. A modification of the formol ether concentration technique for increased sensitivity in detection of *Schistosoma mansoni* eggs. **Am J Trop Med Hyg**, v. 25, n. 6, p. 818-823, 1976. doi: 10.4269/ajtmh.1976.25.818.

KNUDSEN, G. M. et al. Analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 1862-1875, 2005. doi: 10.1074/mcp.M500097-MCP200.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010. doi: 10.1590/s0074-02762010000400012.

LANDIS, J. R. & KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, s. 1, p. 141-151, 1998. doi: 10.1590/s0074-02761998000700020.

LI, E. Y. et al. Improving public health control of schistosomiasis with a modified WHO strategy: a model-based comparison study. **Lancet Glob Health**, v. 7, n. 10, p. e1414-e1422, 2019. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30346-8.

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 Negl Trop Dis**, v. 12, n. 3, e0006274, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006274.

LINNET, K. et al. Quantifying accuracy of a diagnostic test or marker. **Clin Chem**, v. 58, n. 9, p. 1292-1301, 2012. doi: 10.1373/clinchem.2012.182543.

LIU, C. & BANG, F. B. Agglutination of cercariae of *Schistosoma mansoni* by immune sera. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 74, n. 1, p. 68-72, 1950. doi: 10.3181/00379727-74-17812.

LIU, F. et al. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 1236-1251, 2009. doi: 10.1074/mcp.M800538-MCP200.

LUDOLF, F. et al. Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, e2745, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002745.

LUTZ, A. *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis observed in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 109-140, 1919.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. W636-W641, 2019. doi: 10.1093/nar/gkz268.

MAKAROVA, E. et al. Detection of IgG binding to *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26 is a sensitive and specific method for acute schistosomiasis diagnosis. **Parasitol Int**, v. 54, n. 1, p. 69-74, 2005. doi: 10.1016/j.parint.2004.12.001.

MAKAROVA, E. et al. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. **Parasitol Int**, v. 52, n. 4, p. 269-79, 2003. doi: 10.1016/s1383-5769(03)00031-x.

MARTINS-FILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy treatment in human chagas disease. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 2, n. 5, p.569-573, 1995. doi: 10.1128/cdli.2.5.569-573.1995.

MARTINS, A. V. Sobre a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método de sedimentação-concentração. **Brazil-médico**, v. 51, p. 319-321, 1937.

MATOSO, L. F. et al. Longitudinal analysis of antigen specific response in individuals with *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 107, n. 12, p. 797-805, 2013. doi: 10.1093/trstmh/trt091.

McCARTHY, J. S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: diagnostics for control and elimination programmes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 4, p. e1601, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001601.

McLAREN, M. L. et al. Serodiagnosis of human *Schistosoma mansoni* infections: enhanced sensitivity and specificity in ELISA using a fraction containing *S. mansoni* egg antigens omega 1 and alpha 1. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 75, n. 1, p. 72-79, 1981. doi: 10.1016/0035-9203(81)90014-6.

McMANUS, D. P. Defeating Schistosomiasis. **N Engl J Med**, v. 381, n. 26, p. 2567-2568, 2019. doi: 10.1056/NEJMe1913771.

McMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Dis Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, 2018. doi: 10.1038/s41572-018-0013-8.

MENINGHER, T. et al. Schistosomal microRNAs isolated from extracellular vesicles in sera of infected patients: a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis. **J Infect Dis**, v. 215, n. 3, p. 378-386, 2017. doi: 10.1093/infdis/jiw539.

MILLER, P. & WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 267-288, 1980. doi: 10.1017/s0031182000000743.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2 ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mapa da distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de percentual de positividade, por município. Brasil, 2009-2017. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>>. Acesso em Janeiro de 2020.

MINNING, W. Immunbiologische Nachweismethoden bei Bilharziosen, **Deutsche Tropenmedizinische Zeitschrift**, v. 45, p. 321-323, 1941.

MUTAPI, F. et al. Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 3, p. 181-192, 2011. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01270.x.



NENE, V. et al. Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. **Mol Biochem Parasitol**, v. 21, n. 2, p. 179-188, 1986. doi: 10.1016/0166-6851(86)90021-6.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 12, E63, 2000. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.

NOYA, B. A. et al. New approaches for the control and eradication of schistosomiasis in Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, s. 4, p. 227-31, 1992. doi: 10.1590/s0074-02761992000800035.

OGONGO, P.; KARIUKI, T. M.; WILSON, R. A. Diagnosis of schistosomiasis mansoni: an evaluation of existing methods and research towards single worm pair detection. **Parasitology**, v. 145, n. 11, p. 1355-1366, 2018. doi: 10.1017/S0031182018000240.

OLIVEIRA, E. J. et al. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 4, p. 360-366, 2008. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.11.008.

OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, v. 93, n. 1, p. 30-35, 2004. doi: 10.1007/s00436-004-1088-6.

OLIVER-GONZALEZ, J. Anti-egg precipitins in the serum of humans infect with *Schistosoma mansoni*. **J Infect Dis**, v. 95, n. 1, p. 86-91, 1954. doi: 10.1093/infdis/95.1.86.

OTTOLINA, C. & ATENCIO, H. M. Nuevos caminos para o diagnóstico clínico preciso de la schistosoiasis mansoni. **Rev Policlinica Caracas**, v. 12, p. 348-380, 1943.

PAN, C. T.; Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 14, n. 6, p. 931-976, 1965. doi: 10.4269/ajtmh.1965.14.931.

PATZ, J. A. et al. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1395-1405, 2000. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00141-7.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p.499-511. 2002. doi: 10.1038/nri843.

PERALTA, J. M. & CAVALCANTI, M. G. Is POC-CCA a truly reliable test for schistosomiasis diagnosis in low endemic areas? The trace results controversy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 11, e0006813, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006813.

PEREIRA, W. R. et al. *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: Analysis of exposure risk. **Acta Trop**, v. 113, n. 1, p. 34-41, 2010. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.09.001.

PEREZ-SANCHEZ, R. et al. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. **Proteomics**, v. 6, s. 1, p. S226-S236, 2006. doi: 10.1002/pmic.200500420.

PEREZ-SANCHEZ, R. et al. A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. **Mol Biochem Parasitol**, v. 161, n. 2, p. 112-123, 2008. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.06.011.

PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and *in vitro* praziquantel treatment. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 4, p. 527-533, 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.12.003.

PINHEIRO, M. C. et al. 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**, v. 107, n. 7, p. 873-876, 2012. doi: 10.1590/s0074-02762012000700006.

PIRAJÁ da SILVA, M. A. Contribuição para o estudo da schistosomíase na Bahia. **Braz Med**, v. 22, p. 281-282, 1908.

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. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 1, p. 150-154, 1998. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.150.

POMARI, E.; PIUBELLI, C.; BISOFFI, Z. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 25, n. 12, p. 1510-1516, 2019. doi: 10.1016/j.cmi.2019.06.009.

PONTES, L. A. et al. Comparison of polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 6, p. 652-656, 2003. doi: 10.4269/ajtmh.2003.68.652.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by Polymerase Chain Reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 2, p. 157-162, 2002. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.157.

PRATA, A. & BINA, J. C. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (a study of 20 patients observed during a 5 year period). **Gaz Med Bahia**, v. 68, p. 49-60, 1968.

PROTASIO, A. V. et al. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, e1455, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001455.

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 669-676, 1997. doi: 10.1590/s0074-02761997000500021.

RABELLO, A. L. et al. Humoral immune responses in acute schistosomiasis mansoni: relation to morbidity. **Clin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 608-615, 1995. doi: 10.1093/clinids/21.3.608.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. **Guanabara Koogan**, 2001.

ROCHA, C. P. Estudo do perfil de reconhecimento antigênico de proteínas do *Schistosoma mansoni* pelo soro de indivíduos de área endêmica para esquistossomose. **Trabalho de Conclusão do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Minas Gerais**, 2015.

RODRIGUES, I. A. Caracterização do antígeno de *Schistosoma mansoni*, Sm-p40, potencialmente capaz de distinguir os estados clínicos da esquistossomose mansônica. **Trabalho de Conclusão do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Belo Horizonte**, 2014.

ROLLINSON, D. & SIMPSON, A. The Biology of Schistosomes - From genes to Latrines. Academic Press, **Harcourt Brace Jovanovich**, 1987.

ROLLINSON, D. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Trop**, v. 128, n. 2, p. 423-440, 2013. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.04.013.

ROOBSOONG, W. et al. A rapid sensitive, flow cytometry-based method for the detection of *Plasmodium vivax*-infected blood cells. **Malar J**, v.13, n. 1, p. 55-65, 2014. doi: 10.1186/1475-2875-13-55.

SADUN, E. H.; WILLIAMS, J. S.; ANDERSON, R. I. Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of schistosomiasis in humans. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 105, p. 289-291, 1960. doi: 10.3181/00379727-105-26087.

SAMBON, L. W. Descriptions of some new species of animal parasites. **Proc Zool Soc London**. v. 1907, p. 282-283, 1907.

SARHAN, R. M. et al. Comparative analysis of the diagnostic performance of adult, cercarial and egg antigens assessed by ELISA, in the diagnosis of chronic human *Schistosoma mansoni* infection, **Parasitol Res**, v. 113, n. 9, p. 3467-3476, 2014. doi: 10.1007/s00436-014-4017-3.

SARVEL, A. K. et al. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, e990, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0000990.

SELIGER, B. & KELLNER, R. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. **Proteomics**, v. 2, n. 12, p. 1641-1651, 2002. doi: 10.1002/1615-9861(200212)2:12<1641::AID-PROT1641>3.0.CO;2-B.

SENRA, C. et al. Development of a laboratorial platform for diagnosis of schistosomiasis mansoni by PCR-ELISA. **BMC Res Notes**, v. 11, n. 1, p. 455-459, 2018. doi: 10.1186/s13104-018-3571-7.

SETERFIT, L. B. Immobilization of *Schistosoma mansoni* miracidia by immune sera. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 84, n. 1, p. 5-7, 1953. doi: 10.3181/00379727-84-20523.

SILVA-MORAES, V. et al. Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infections in endemic area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 3, e0006974, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0006974.

SILVA, L. M. et al. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Trop**, v. 91, n. 2, p. 189-196, 2004. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.05.008.

SIQUEIRA, L. M. V. 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**, v. 106, n. 7, p. 844-850, 2011. doi: 10.1590/s0074-02762011000700010.

SIQUEIRA, L. M. 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**, v. 110, n. 2, p. 209-214, 2015. doi: 10.1590/0074-02760140375.

SMITH, H. et al. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 9, e1815, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001815.

SOLOMON, A. W. et al. A diagnostics platform for the integrated mapping monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: rationale and target product profiles. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, e1746, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001746.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-425. 2006. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70521-7.

STEK, M. et al. Comparison of an enzyme-linked immunoabsorbent assay using crude *S. haematobium* soluble egg antigen with a radioimmunoassay using purified *S. mansoni* egg antigen for the serodiagnosis of schistosomiasis *haematobium*. **J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1985.

STIREWALT, M. A.; *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv Parasitol**, v. 12, p. 115-82, 1974. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60388-7.

SYMMERS, Wm. St. C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. **J Pathol Bact**, v. 9, n. 2, p. 237-239, 1904. doi.org/10.1002/path.1700090211.

TANIGAWA, C. et al. Species-specific serological detection for schistosomiasis by serine protease inhibitor (SERPIN) in multiplex assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, e0004021, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0004021.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas Disease and Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 10, n. 4, e0122938, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0122938.

TEIXEIRA, C. F. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 2, e73, 2007. doi: 10.1371/journal.pntd.0000073.

TOOR, J. et al. Achieving elimination as a public health problem for *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: when is community-wide treatment required? **J Infect Dis**, v. 221, s. 5, p. S525- S530, 2020. doi: 10.1093/infdis/jiz609.

TURNER, P. et al. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. **J Clin Pathol**, v. 57, n. 11, p. 1193-1196, 2004. doi: 10.1136/jcp.2003.014779.

UTZINGUER, J. et al. New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 6, p. 529-542, 2015. doi: 10.1016/j.cmi.2015.03.014.

UTZINGER, J. 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**, v. 122, p. 537:544, 2001. doi: 10.1017/s0031182001007752.

VAN BALKOM, B. W. et al. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental subproteome. **J Proteome Res**, v. 4, n. 3, p. 958-966, 2005. doi: 10.1021/pr050036w.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. & DeMARCO, R. Current developments on *Schistosoma* proteomics. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 183-185, 2008. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.04.017.

VERWEIJ, J. J. & STENSVOLD, C. R. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 2, p. 371-418, 2014. doi: 10.1128/CMR.00122-13.

VOGEL, H. & RUNNING, W. Hüllenbildung bei Bilharzia-Cercarien im serum bilharzia-infizierter Tiere und Menschen. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 153, p. 91-105, 1949.

WEERAKOON, G. A. D. K. et al. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 4, p. 939-967, 2015. doi: 10.1128/CMR.00137-14.

WHO - World Health Organization. Schistosomiasis. Disponível em: <<https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>> Acesso em: Janeiro de 2020.

WICHMANN, D. et al. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 4, e422, 2009. doi: 10.1371/journal.pntd.0000422.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med J Australia**, v. 2, n. 18, p. 375-376, 1921. doi: 10.5694/j.1326-5377.1921.tb60654.x.

WILSON, R. A. & COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 9, p. 423-431, 2009. doi: 10.1016/j.pt.2009.05.011.

WU, X. J. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 164, n. 1, p. 32-44, 2009. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.005.

YU, J. M. et al. Variations in fecal *Schistosoma japonicum* egg counts. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 3, p. 370–375, 1998. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.370.

ZHANG, Y. Y. et al. Evaluation of Kato–Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: A Bayesian modeling approach. **Acta Tropica**, v. 112, n. 1, p. 16-22, 2009. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.05.020.

ZICKER, F.; KATZ, N.; WOLF, J. Avaliação do teste de eclosão de miracídios na esquistossomose mansoni. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 19, n. 3, p. 202-207, 1977.

**ANEXO I - LISTA DE ANTICORPOS COMERCIAIS**

1. Anticorpo monoclonal IgG2a de camundongo Anti-His Antibody (GE HealthCare). Número de catálogo: 27-4710-01. Lote: 9469933.
2. Anticorpo monoclonal IgG1 de camundongo Anti-His (C-Term) - HRP (NOVEX). Número de catálogo: 46-0707. Lote: 1223410.
3. Mouse IgG1 Penta-His Antibody BSA-free (QIAGEN). Número de catálogo: 34660. Lote: 154031954.
4. Goat anti-mouse IgG, Human ads-HRP (SouthernBiotech). Número de catálogo: 103005. Lote: D5012-RK53.
5. Goat anti-mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Biotin (Thermo Fischer). Número de catálogo: A16082. Lote: 3427092013.
6. Anti-Human IgG (Fc specific) – Peroxidase antibody produced in goat HRP (SIGMA). Número de catálogo: A0170. Lote: 116M4809V.
7. Goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Biotin. (Invitrogen). Número de catálogo: A18815. Lote: 42-175-080614.
8. Anti-Human IgG4-Biotin antibody, Mouse monoclonal (clone HP-6025) purified from hybridoma cell culture (SIGMA). Número de catálogo: B3648. Lote: 013K4897.
9. Goat Anti-Human IgA ( $\alpha$ -chain specific) FITC (SIGMA). Número de catálogo: F5259. Lote: SLBT7111.
10. Streptavidin HRP (BD Pharmigen). Número de catálogo: 554066. Lote: M060711.
11. PE Streptavidin (BD Pharmigen). Número de catálogo: 554061. Lote: 7090576.