



MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES q-PCR, Nested-PCR, PCR Multiplex E LAMP-PCR NA DETECÇÃO DE *Schistosoma mansoni* EM HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS E DEFINITIVOS

FRANCISCO LUCAS SILVA DE LIMA; JANIELMA SENA DOS SANTOS

RESUMO

Introdução: A esquistossomose, causada pelo trematódeo *S. mansoni*, é uma das parasitoses entre as doenças tropicais negligenciadas. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são os hospedeiros intermediários do parasita, desempenhando um papel crucial no ciclo de transmissão da doença aos seres humanos, hospedeiros definitivos. Portanto, a detecção precoce e precisa do parasita em humanos e caramujos é crucial para o controle da doença, com o auxílio de métodos moleculares como a qPCR, Nested-PCR, PCR Multiplex e LAMP-PCR. **Objetivo:** É demonstrar os métodos de diagnósticos moleculares mais sensíveis e promissores para a detecção de *Schistosoma mansoni* em hospedeiros intermediários e definitivos. **Metodologia:** Foi realizado um estudo exploratório de revisão sobre o tema, desenvolvido a partir de fontes de informação relevantes para o estudo, obtidas através das bases de dados científicas como PubMed e SciELO. Consultados repositórios de teses e dissertações, bem como bibliotecas virtuais de universidades reconhecidas na área de parasitologia e biologia molecular. Utilizando como descritores em pesquisa: “*Schistosoma mansoni*”, “*Biomphalaria*”, “métodos diagnósticos moleculares”, “PCR”, “qPCR”, entre outros. Os termos foram combinados utilizando operadores booleanos (AND, OR) para ampliar a abrangência da busca. E estabelecidos critérios de inclusão e exclusão para a qualidade da pesquisa. **Resultados:** Foi observado que os métodos moleculares qPCR e Nested-PCR apresentaram uma maior sensibilidade para a detecção de *Schistosoma spp.* chegando a 86,7% de sensibilidade em exames. Entretanto, a qPCR pôde ser mais promissora nas regiões de baixa endemicidade e em hospedeiros com baixa carga parasitária, devido à alta sensibilidade para detecção de pequenas quantidades de material genético e seu baixo risco de contaminação. **Conclusão:** Conclui-se, que os métodos diagnósticos moleculares representam uma ferramenta poderosa para a detecção de *Schistosoma spp.* em seres humanos e caramujos do gênero *Biomphalaria*. Onde sua sensibilidade, especificidade e rapidez tornam-se essenciais para programas de controle da esquistossomose, possibilitando intervenções mais eficazes e direcionadas para interromper o ciclo de transmissão do parasito.

Palavras-chave: Esquistossomose mansoni; diagnósticos moleculares; PCR; Schistosoma; Sensibilidade.

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária ocasionada pela infecção do verme trematódeo *Schistosoma spp.*, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. O *Schistosoma mansoni*, é um endoparasita obrigatório que necessita de um hospedeiro intermediário, como caramujos do gênero *Biomphalaria*, e de hospedeiros definitivos, tais como seres humanos e

outros mamíferos (Rocha *et al.*, 2016). Portanto, a detecção precoce e precisa do parasita em humanos e caramujos é crucial para o controle da doença. Os métodos tradicionais de detecção de esquistossomose, com auxílio do kato-katz em microscopia e a observação de cercárias em lâminas mediante foto estimulação, são sensíveis, mas muitas vezes demorados e exigem habilidades técnicas especializadas, podendo falhar em detectar infecções de baixa intensidade.

Os métodos diagnósticos moleculares oferecem uma abordagem mais sensível e específica para a detecção de *Schistosoma* em seres humanos e caramujos. Entre esses métodos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou PCR Convencional é amplamente utilizada devido à sua alta sensibilidade e capacidade de detecção mesmo em baixas cargas parasitárias (Melo, 2006). Em que esta permite amplificar regiões específicas do DNA do parasita, como o gene ribossômico, e variar a técnicas mais específicas e eficazes como o qPCR, Nested-PCR, PCR Multiplex e LAMP-PCR (Gonzaga, 2023). Tendo como benefícios dos métodos moleculares uma maior sensibilidade, especificidade e automatização. Destarte, o objetivo deste estudo é demonstrar os métodos de diagnósticos moleculares mais sensíveis e promissores para a detecção de *schistosoma mansoni* em hospedeiros intermediários e definitivos e as especificidades de cada método.

2 METODOLOGIA

O estudo trata-se de uma revisão de literatura de caráter exploratório, desenvolvida com o intuito de demonstrar técnicas moleculares que podem ser utilizadas para minimizar os diagnósticos de falsos negativos em hospedeiros definitivos e intermediários do *schistosoma mansoni*. Inicialmente, foram identificadas fontes de informação relevantes para o tema, obtidas através das bases de dados científicas como PubMed e Scielo. Além disso, foram consultados repositórios de teses e dissertações, bem como bibliotecas virtuais de universidades reconhecidas na área de parasitologia e biologia molecular. A estratégia de busca foi desenvolvida com base em termos de indexação relacionados ao tema, incluindo "*Schistosoma mansoni*", "*Biomphalaria*", "métodos diagnósticos moleculares", "PCR", "qPCR", entre outros. Os termos foram combinados utilizando operadores booleanos (AND, OR) para ampliar a abrangência da busca.

Foram estabelecidos critérios de inclusão para a seleção dos estudos, os quais incluíam artigos científicos, revisões, teses e dissertações que abordassem especificamente métodos diagnósticos moleculares para detecção de *Schistosoma mansoni*. Foram excluídos estudos que não estivessem disponíveis em formato completo, não estivessem relacionados ao tema de interesse ou fossem considerados de baixa qualidade metodológica. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, os estudos foram triados em duas etapas: primeiro, por meio da leitura dos títulos e resumos para identificar aqueles potencialmente relevantes; em seguida, a leitura completa dos artigos selecionados para determinar sua inclusão final na revisão.

Os dados extraídos foram analisados e sintetizados para identificar padrões, tendências e lacunas no conhecimento relacionado aos métodos diagnósticos moleculares para detecção de *Schistosoma* spp. As informações obtidas foram então organizadas e apresentadas de maneira clara e objetiva. Foi realizada uma avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos, considerando aspectos como delineamento do estudo, amostragem, descrição dos métodos utilizados e análise de resultados. Esta avaliação foi importante para garantir a confiabilidade e validade dos achados da revisão. Todos os procedimentos realizados durante a revisão foram conduzidos conforme princípios éticos e normas de conduta científica, garantindo a integridade e o respeito aos direitos dos autores e participantes envolvidos nos estudos revisados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A esquistossomose mansoni é uma parasitose prevalente no Brasil, ocasionada pela infecção do helminto *Schistosoma mansoni* em hospedeiros intermediários caramujos do gênero *Biomphalaria* spp. subsequentes a contaminação do ambiente límbico para infecção de hospedeiros definitivos como seres humanos (Friani *et al.*, 2023). Nisso, os diagnósticos “padrão-ouro” para a doença, em seres humanos, é o teste parasitológico de Kato-Katz, e em caramujos, o exame de foto estimulação, que identificam infectados e sua carga parasitária de ovos e liberação de cercárias, subsequentes. Entretanto, apresenta pouca sensibilidade em áreas de baixa endemicidade e em ambientes de estresse, no caso dos caramujos. Dessa forma, faz-se necessária a otimização de testes de diagnóstico mais eficazes, para identificação das reais áreas de transmissão da doença. Por isso, o grande problema no contexto da saúde pública é a carência de métodos diagnósticos sensíveis que identifiquem pacientes e moluscos, assintomáticos e falso-negativos. Tendo como potenciais técnicas, os exames diagnósticos moleculares PCR, que otimizam a sensibilidade. Podendo detectar infecções de baixa intensidade, aumentando a especificidade, reduzindo o risco de falsos negativos e aumentando a rapidez dos resultados sendo obtidos em poucas horas, além da automatização, no qual alguns métodos moleculares podem ser automatizados, facilitando o processamento de grandes volumes de amostras. Podendo consistir em técnicas de PCR Convencional, variando em qPCR, Nested-PCR, PCR Multiplex e LAMP-PCR (Gonzaga, 2023).

O PCR Convencional amplifica regiões específicas do DNA do parasita, como o gene ribossômico, podendo ser utilizado como diagnóstico da esquistossomose, visa a detecção molecular da presença de *S. mansoni*. Utilizando primers externos F3 e B3 desenhados por Fernández-Soto et al., 2014. Em que atuam como reagentes iniciadores (primers), sintetizados para serem complementares às sequências conhecidas do DNA alvo, grande quantidade dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e a enzima termoestável Taq DNA-polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* e tampão (Eisenstein, 1990). Replicando genes de interesse mediante ciclos a partir das etapas de desnaturação, anelamento e extensão (Melo, 2006).

Tendo, a partir do uso da PCR convencional, o surgimento de variações da ferramenta molecular com o intuito de obter novas alternativas de análises (Gonzaga, 2023). Como, a PCR Multiplex, amplificando mais de um segmento diferente de DNA em uma única reação (MELO, 2006); a qPCR ou PCR em tempo real, utilizada para quantificação da replicação do material genético, sem o uso de eletroforese e evitando contaminações externas na reação (Espírito-Santo et al., 2014 A). Nested-PCR, duas reações de dupla amplificação, em que o produto da primeira é aplicado na segunda, aumentando a sensibilidade (MELO, 2006) e o LAMP-PCR, que ocorre em temperaturas variáveis e a visualização do produto podendo ser realizada com adição de corante ao próprio tubo de reação (Gomes; Júnior; Melo, 2022).

Possuindo apenas, como desafios a serem contornados por esses métodos moleculares, os altos custos financeiros e de investimento para suas aquisições, o cuidado ao ajuste das condições ideais de concentração dos componentes da reação, a utilização de indutores específicos nos fragmentos de DNA e o alto risco da contaminação em contato com o ambiente (Melo, 2006).

Nos estudos de Melo; 2006, Espírito-Santo et al., 2014 B; Gonzaga, 2023, o sistema de qPCR otimizado e a Nested-PCR foram utilizados sobre as amostras de DNA das fezes, e obtiveram excelentes resultados comparados a métodos de diagnósticos usuais de microscopia e a outros métodos moleculares. Nos quais, os resultados de Espírito-Santo et al., 2014 B, Gonzaga, 2023, mostraram que a sensibilidade epidemiológica foi de 73,3% para Kato-Katz; 66,7% para Hoffman; e o mesmo valor de 86,7% para Nested-PCR e qPCR.

O PCR multiplex, de acordo com o estudo de Mesquita et al., 2020, mostrou-se promissor na identificação molecular específica de famílias de helmintos causadores da

esquistossomose, diferenciando as famílias de trematódeos Clinostomidae, Echinostomatidae, Schistosomatidae e Strigeidae. Utilizando o rDNA como marcador molecular como forma de taxonomia e sistemática em trematódeos. Os iniciadores concebidos geraram produtos de PCR específicos da família com tamanhos diferentes: 115, 140, 172 e 183 pb para as famílias Clinostomidae, Schistosomatidae, Echinostomatidae e Strigeidae, respectivamente, sendo capazes de detectar uma condição de coinfeção em um hospedeiro potencial (Mesquita et al.,2020).

No método de LAMP-PCR, tendo uma sensibilidade menor e um menor custo em relação aos demais exames diagnósticos moleculares, segundo Mesquita, et al.,2021, em seu estudo, esse método diagnóstico pode chegar a 100% de especificidade e a 85,7% sensibilidade de positividade em infectados. Detectando a presença de *S.mansoni* mesmo quando os caramujos não liberaram cercárias, o que fornece informações valiosas para os serviços de vigilância, uma vez que em muitas áreas endêmicas os caramujos recolhidos raramente liberam cercárias, embora a transmissão da esquistossomose continue presente (Mesquita, et al.,2021).

Dessa forma, de acordo com os estudos descritos é demonstrado todos os potenciais no desenvolvimento e aplicação de técnicas de diagnóstico molecular, em que é explicitado que a qPCR pode ser promissora nas regiões de baixa endemicidade e em hospedeiros com baixa carga parasitária, devido à alta sensibilidade para detecção de pequenas quantidades de material genético e seu baixo risco de contaminação. E que o conhecimento sobre a presença de uma família de trematódeos com a utilização do PCR multiplex em uma determinada área pode prever potenciais impactos à saúde e encontrar co-infecções de parasitos em hospedeiros definitivos e intermediários. Podendo ainda ser utilizados métodos moleculares de boa qualidade e de baixo custo financeiro, como o LAMP-PCR, no auxílio diagnóstico da doença em regiões onde necessite uma melhor identificação parasitária.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se, que métodos diagnósticos moleculares representam uma ferramenta poderosa para a detecção de *Schistosoma spp.* em seres humanos e caramujos do gênero Biomphalaria. Onde sua sensibilidade, especificidade e rapidez tornam-os essenciais para programas de controle da esquistossomose, possibilitando intervenções mais eficazes e direcionadas para interromper o ciclo de transmissão do parasita. Sendo recomendado mais estudos sobre os métodos moleculares descritos, visto o real potencial de suas aplicações.

REFERÊNCIAS

ESPÍRITO-SANTO, M. C.; ALVARADO-MORA, M.V.; PINTO P.L.;BRITO, T.;BOTELHO-LIMA, L.S.;HEALTH, A.R.; AMORIM, M.G.; DIAS-NETO, E.; CHIEFFI,P.P; PINHO, J.R.; E.J. CARRILHO, F.J.;LUNA,E.J.; GRYSCEK, R.C. C. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan® Real-Time PCR in a hamster model. **Experimental Parasitology**, 1 ago. 2014. v. 143, p. 83–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24858959/>. Accessed: 1 mai. 2024. A

ESPÍRITO-SANTO, M. C.; ALVARADO-MORA, M.V.; DIAS-NETO, E.; BOTELHO-LIMA, L.S.; MOREIRA, J.P. AMORIM, M.; PINTO P.L.; HEALTH, A.R.; CASTLHO, V.L.; GONÇALVES, E.M.; LUNA, E.J. CARRILHO, F.J.; PINHO, J.R.; GRYSCEK, R.C. Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25338651/>. Accessed: 1 mai. 2024. B

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 322, n. 3, p. 178-183, Jan. 18. 1990.

FERNÁNDEZ-SOTO P.; ARAHUETES J.G.; HERNÁNDEZ A.S.; ABÁN J.L.; Vicente SANTIAGO, V.B.; MURO A. 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** 2014; 8 e 3126. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003126>. Accessed: 3 jan. 2024.

FRIANI, G; AMARAL, A.M.R.; QUINELATO, S.; SILVA, C.C.M.; GOLO, P.S. Controle biológico de *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma* spp.: uma revisão sistemática. **Ciência Rural** [Internet]. 2023;53(4):e20210714. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210714>. Acesso: 3 jan. 2024.

GOMES, E. C. S.; JÚNIOR, W. L. B.; MELO, F. L. Evaluation of SmITS1-LAMP performance to diagnosis schistosomiasis in human stool samples from an endemic area in Brazil. **Experimental Parasitology**, 1 nov. 2022. v. 242, p. 108389–108389. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36206937/#full-view-affiliation-1>. Accessed: 2 mai. 2024

GONZAGA, B.S. **Aplicação de Sm1-7qPCR para detecção de DNA de Schistosoma mansoni em modelo murino com infecção controlada**. 2023. 57 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para detecção de Schistosoma mansoni**. 2006. 114 páginas. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Instituto Aggeu Magalhães, Recife-PE. 2006.

MESQUITA, S.G.; RODRIGUES-LUIZ, G.F.; REIS-CUNHA J.L.; CARDOSO M.S.; Cristiane Lafetá Furtado De MENDONÇA C.L.F.; BUENO, L.L.; Ricardo Toshio FUJIWARA R.T.; Pinto, H.A.; , Roberta Lima CALDEIRA, R.L.; Daniella Castanheira BARTHOLOMEU, D.C. A multiplex PCR protocol for rapid differential identification of four families of trematodes with medical and veterinary importance transmitted by *Biomphalaria* Preston, 1910 snails. **Acta Trop.** 2020; 211:105655., 211, 105655. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105655>. Accessed: 2 mai. 2024

MESQUITA, S.G.; NEVES, F.G.; SCHOLTE, R.G.C.; CARVALHO, O.S.; FONSECA, C.T.; CALDEIRA, R.L. Um ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop para detecção de *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria* spp. de áreas endêmicas para esquistossomose em Minas Gerais, Brasil. **Vetores de parasitas** 14, 388 .2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04888-y>

ROCHA T.J.M; SANTOS M.C.S; LIMA M.V.M; CALHEIROS C.M.L; WANDERLEY F.S. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde** [Internet]. 2016 un;7(2):27-32. Disponível em: <https://doi.org/doi.org/10.5123/S2176-62232016000200003>.