



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado em Saúde Pública



**ANA LISA DO VALE GOMES**

---

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA DETECÇÃO  
MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *SCHISTOSOMA MANSONI* EM  
LOTES DE MOLUSCOS VETORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
FOCOS DE TRANSMISSÃO**

---

RECIFE  
2008

ANA LISA DO VALE GOMES

Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Frederico Guilherme Coutinho Abath *in memoriam*,  
Constança Simões Barbosa  
Carlos Eduardo Calzavara Silva.

Recife  
2008

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

G636i Gomes, Ana Lisa do Vale.

Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão / Ana Lisa do Vale Gomes. — Recife: A. L. do V. Gomes, 2008.

101 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*), Constança Simões Barbosa e Carlos Eduardo Calzavara Silva.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Molusco. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Abath, Frederico Guilherme Coutinho. II. Barbosa, Constança Simões. III. Silva, Carlos Eduardo Calzavara. IV. Título.

---

CDU 616.995.122

ANA LISA DO VALE GOMES

Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansonii* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Aprovada em: 16/01/2008**

*Banca Examinadora*

---

PhD Constança Simões Barbosa (Orientadora)  
**CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

PhD Fábio Lopes de Melo  
**CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

PhD Glória Regina Franco  
**UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais**

---

PhD Osvaldo Pompílio de Melo Neto  
**CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

PhD Rita de Cássia Carvalho Maia  
**CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz;  
Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães;  
À coordenação do curso de Mestrado em Saúde Pública  
Ao Departamento de Imunologia, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular,  
Laboratório de Esquistossomose, LaViTe, IBMP, UFMG, CAPES.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ana Maria do Vale, Aldenôr Gomes, Mariana do Vale, Ênio Gomes, Maria do Vale, Ieda Antunes, Vânia, Luiza Reis, Ana Maria Silva, Fabio Lopes, Roberto Werkhauser, Christian Probst, Renata Freire, Fernando Coutinho, Nilda, Nalvinha, Márcia, Ernesto Marques, Mariana Eufrazio, Candido Ferraz, Constança Barbosa, Carlos Eduardo Calzavara, Glória Franco, Rita Maia, André Furtado, Rosineide Lira, Mineo, Cássia Docena, Valéria Rego, prof Djalma, Silvia Montenegro, Edeneide, Edileuza, Laura Gil, Mariane Britto, Barnabé, Miruca, Fernando, Marli Tenório, Diogo, Simone, pessoal da informática e da biblioteca.

*Frederico Abath.*

GOMES, Ana Lisa do Vale.

## RESUMO

A identificação de moluscos infectados pelo *Schistosoma mansoni* é de grande interesse para a saúde pública, pois representa focos de transmissão da esquistossomose. As limitações da técnica padrão-ouro para o diagnóstico de infecções pré-patentes e em larga escala faz com que os métodos moleculares sejam vistos como possíveis alternativas através da detecção de DNA do *S. mansoni* em lotes de moluscos vetores. A detecção de seqüências específicas de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) tem confirmado ser de extremo valor para a análise genética e diagnóstico de várias doenças patogênicas infecciosas. O principal objetivo desse trabalho é desenvolver e validar a detecção molecular da infecção por *S. mansoni* em lotes de moluscos vetores para a identificação de focos de transmissão. Os iniciadores foram desenhados para detectar especificamente DNA de *S. mansoni* e amplificam gene na subunidade pequena do rRNA. Neste trabalho foi desenvolvido PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e validada juntamente com ensaios de PCR, *nested* PCR (NPCR) e *nested* PCR em único tubo (STNPCR). Quando comparados as duas metodologias relacionadas ao padrão-ouro e abordagens moleculares os resultados confirmaram que a NPCR, STNPCR e a qPCR são significativamente mais sensíveis ( $p < 0.05$ ) que a PCR e que a técnica padrão-ouro. Significante relação foi observada entre os resultados da qPCR e a liberação de cercarias. As ferramentas moleculares desenvolvidas neste trabalho, se utilizadas em lotes de moluscos, podem ser consideradas alternativas e/ou complementares à técnica convencional para identificar focos de transmissão da esquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, molusco e Reação em Cadeia da Polimerase.

## ABSTRACT

The identification of snails infected by *Schistosoma mansoni* may indicate the transmission sites of schistosomiasis and consequently, has become a relevant issue in public health. The actual golden-standard test used on schistosomiasis diagnosis shows technical limitations on detecting the parasite in prepatent infections. Furthermore, the necessity of large-scale tests makes the molecular approaches a suitable alternative to detect *S. mansoni* DNA in pools of the vector snails. The detection of specific DNA sequences by PCR has proved to be extremely valuable for the analysis of genetic disorders and the diagnosis of a variety of infectious disease pathogens. The main objective of this study is to develop and validate molecular approaches, based on PCR, to detect *S. mansoni* DNA in vector snails to be used on identifying the transmission focus. Primers targeting the gene encoding the small subunit rRNA was designed to amplify DNA from *S. mansoni* with high specificity. Real time PCR assays were developed and validated along with two-step nested PCR (NPCR), single-tube nested PCR (STNPCR) and also quantitative PCR. The results confirmed that the majority of the molecular detection systems showed a higher level of sensitivity than the golden-standard method. Also, a significant relationship was observed between the qPCR results and cercarial shedding. These findings demonstrate that these molecular approaches are able to detect prepatent infection in vector snails and also that PCR-based protocols have potential to become useful tools for monitoring Schistosome transmission.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, vector snails and polymerase chain reaction

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo Evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	26
Figura 2 - Cinética da reação de PCR	27
Figura 3 - Curva de amplificação originada a partir da qPCR	28
Figura 4 - Curvas de dissociação.	29
Figura 5 - Região de coleta	48
Figura 6 - Mapa de Sotave II.	49
Figura 7 - Ilustração de <i>Biomphalaria</i>	50
Figura 8 - Purificação de DNA. Painel apresentando 4 diferentes fases da extração e purificação de DNA em amostras de lotes de moluscos.	51
Figura 9 – Diagnóstico da infecção de molusco	52
Figura 10 - Iniciadores internos imobilizados na superfície Interna da tampa do microtubo	53
Figura 11 - Alinhamento múltiplo usando Clustal W de segmentos do gene que codifica o rRNA 18S de várias espécies.	58
Figura 12 - Painel apresentando informações sobre a qPCR .	59
Figura 13 - Limite de detecção da qPCR	60
Figura 14 - Especificidade da qPCR	61
Figura 15 - Painel apresentando a especificidade dos sistemas de PCR.	62
Figura 16 - Painel mostrando limite de detecção de DNA gênomico de <i>S. mansoni</i> das PCR, NPCR e STNPCR quando testados os lotes de moluscos.	63



Figura 17 - Lotes de moluscos vetores analisados por PCR com iniciadores universais, Unvfo2 e Unvre6.

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 Esquistossomose: aspectos gerais	10
1.2 Ciclo de vida do parasito	11
1.3 Diagnóstico da esquistossomose	13
1.3.1 <u>Humanos</u>	13
1.3.2 <u>Moluscos vetores infectados</u>	14
1.3.3 <u>Coleções de água infectadas</u>	15
1.4 Detecção molecular do <i>Schistosoma mansoni</i>	16
1.4.1 <u>“Polymerase Chain Reaction” - PCR</u>	16
1.4.1.1 <u><i>Nested PCR (NPCR) e Single Tube Nested PCR (STNPCR)</i></u>	17
1.4.1.2 <u><i>PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i></u>	19
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>3 OBJETIVOS</b>	29
3.1 Geral	29
3.2 Específico	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
4.1 Tipo de estudo	30
4.2 Desenho dos iniciadores dos sistemas baseados em PCR	30
4.3 Obtenção de DNA das amostras biológicas	31
4.3.1 <u>DNA de <i>Schistosoma mansoni</i></u>	31
4.3.2 <u>DNA camundongos e humano</u>	31
4.3.3 <u>DNA diferentes trematodos</u>	32
4.3.4 <u>DNA de lotes de moluscos do campo</u>	32
4.4 Análise do DNA	33
4.4.1 <u>Método fenol-clorofórmio</u>	33
4.4.2 <u>Matriz caotrópica de sílica</u>	34
4.4.3 <u>Método utilizando “Genomic Prep Cells and Tissue Isolation Kit” (Amersham Pharmacia Biotech, USA)</u>	35
4.4.4 <u>Quantificação do DNA</u>	36
4.5 Clonagem e seqüenciamento de amplicon	36

4.6	Quantificação dos amplicons	38
4.7	Diagnóstico de infecção de moluscos pela indução de liberação de cercárias	38
4.8	Reações de PCR	39
4.9	<i>Nested</i> PCR em duas etapas (NPCR)	39
4.10	<i>Nested</i> PCR em único tubo (“single tube nested PCR” – STNPCR)	40
4.11	PCR quantitativa em tempo real – qPCR	41
4.12	Determinação da eficiência, especificidade e limite de detecção da qPCR	42
4.13	Análise e registro dos resultados	43
4.14	Análise estatística	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	52
5.1	Desenvolvimento de iniciadores para PCR quantitativa em tempo real	52
5.2	Clonagem e seqüenciamento de amplicon	54
5.3	Determinação da eficiência, especificidade e limite de detecção da qPCR	53
5.4	Determinação da especificidade dos sistemas de detecção molecular (PCR, NPCR, STNPCR).	53
5.5	Extração e purificação de DNA em lotes de moluscos	54
5.6	Identificação de focos de transmissão da esquistossomose através da detecção do DNA de <i>S. mansoni</i> em lotes de moluscos vetores, <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> .	55
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	64
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	69
	<b>REFERÊNCIAS</b>	70
	APÊNDICES A – Artigos publicados	78
	APÊNDICE A.1 – Molecular approaches for the detection of <i>Schistosoma mansoni</i> : possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection	79
	APÊNDICE A.2 – Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis	83
	APÊNDICE A.3 – Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of <i>Schistosoma mansoni</i> DNA	91

ANEXO A – Parecer do CEP/CPqAM	96
ANEXO B – Pedido de Patente	98

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Esquistossomose: aspectos gerais

A esquistossomose é uma doença transmissível causada, no Brasil, pelo trematódeo do gênero *Schistosoma* (REY, 1991). No mundo são 200 milhões de pessoas acometidas pela doença, sendo endêmica em 74 países (Organização Mundial de Saúde, 2006). O *Global Burden of Disease Study* atribui 14000 como número de mortes anuais no mundo por esquistossomose. Apesar da alta prevalência, a morbidade associada a doença é baixa e variável (GRYSEELS et al., 2006).

No Brasil são 6 milhões de infectados pelo verme (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). A distribuição da esquistossomose no Brasil não é muito diferente da constatada há 20 anos. As áreas de média e alta endemicidade constituem uma região contínua, predominando no litoral nordestino, do Ceará até a Bahia e em Minas Gerais. No restante do território nacional a transmissão ocorre em áreas focais e com baixa intensidade (DIAS et al., 1994).

Em Pernambuco, a área endêmica corresponde a 17,5% da área total do Estado, estando 47% dos municípios compreendidos nessa região. O dado mais recente encontrado mostra que segundo o censo de 2000, estima-se que 62% da população de Pernambuco esteja sob risco de infecção (FAVRE et al., 2001).

Entre as espécies de *Schistosoma* infecciosas aos homens destacam-se: *S. mansoni*, transmitido pelo molusco do gênero *Biomphalaria* e causador da esquistossomose intestinal e hepática na África, península Arábica e América do Sul; *S. haematobium*, transmitido pelos moluscos do gênero *Bulinus* e causa esquistossomose urinária na África e na península Arábica, e; *S. japonicum*, transmitido pelo anfíbio do gênero *Oncomelania* que causa esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na China, Filipinas e Indonésia. (GRYSEELS et al., 2006).

No Brasil existem apenas três espécies de *Biomphalaria*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. A *B. glabrata* é amplamente distribuída em todo território brasileiro, transmitindo esquistossomose do norte ao sul do país. Já a *B. tenagophila* é importante na transmissão da esquistossomose no sul do Brasil e a *B. straminea*

se destaca em algumas regiões do nordeste brasileiro (JANNOTTI-PASSOS et al., 2006).

Em Pernambuco, a *B. straminea* e a *B. glabrata* são os dois hospedeiros intermediários do *S. mansoni*. A *B. straminea* é a espécie distribuída na região Agreste, zona de transição da vegetação e na Zona da Mata do Estado. Nessas regiões são mantidos altos níveis de endemicidade apesar das aparentes baixas taxas de infecção natural e laboratorial dessa espécie. *B. glabrata*, com índices de infecção em torno de 20 %, é importante nas aéreas costeira e é responsável por muitos focos ativos de transmissão (FAVRE et al., 2002).

A *B. glabrata* é considerado o vetor mais eficaz devido a sua alta susceptibilidade à infecção e capacidade de transmissão do parasito ao hospedeiro. É também considerado de alta capacidade vetorial devido a ampla distribuição, tornando-se responsável pela manutenção de vários focos ativos da doença (BARBOSA, 1992). Já a *B. straminea* é considerado um vetor de baixa competência vetorial devido à alta resistência em infectar-se pelo *Schistosoma* (PARAENSE, 1986), além da baixa eficiência na produção de cercárias quando comparado ao *B. glabrata* (BARBOSA et al., 2001). No estudo de Favre et al. (1995) são mostradas as diferenças na capacidade de infecção em condições experimentais de *B. glabrata* e *B. straminea* por *S. mansoni*. Neste estudo, 14,9% (64/430) de *B. glabrata* e apenas 0,5% (5/1.145) de *B. straminea* foram infectados pelo parasito. Apesar da baixa taxa de infecção observada no *B. straminea*, de ser considerado de baixa competência e capacidade vetorial, o mesmo possui importância significativa na cadeia epidemiológica de transmissão sendo um vetor importante para esquistossomose no Nordeste brasileiro devido a distribuição, habilidade em invadir e colonizar, associado com a alta prevalência em áreas endêmicas de esquistossomose humana (FAVRE et al., 1995).

## 1.2 Ciclo de vida do parasito

O *S. mansoni* é um parasito multicelular com ciclo biológico complexo, formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo vertebrado/homem, e outra no hospedeiro intermediário -invertebrado/molusco

(Figura 1). Há ainda duas formas larvárias de vida livre no meio aquático (cercária e miracídio), que se alternam às fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e a presença de ovos nas fezes é de cerca de 40 dias. (REY, 1991).

Os vermes adultos vivem nos vasos sangüíneos que ligam o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) do hospedeiro vertebrado. Uma fêmea coloca cerca de 300 ovos por dia, metade deles são eliminados pelas fezes contaminando o meio ambiente ao entrar em contato com a água, eclodem e libertam larvas ciliadas, denominadas de miracídios. A outra metade dos vermes adultos presentes na circulação sanguínea se acumulam nos seguintes órgãos: fígado; baço e eventualmente medula e cérebro (REY, 1991).

O miracídio é o primeiro estágio de vida livre do *Schistosoma*. Onde não há rede de esgotos e as fezes infectadas são lançadas indevidamente em rios e lagos, os miracídios têm a chance de nadar ao encontro do hospedeiro intermediário, o molusco, dando continuidade ao ciclo evolutivo do parasito. Ao penetrar nos moluscos, o miracídio perde parte de suas estruturas (MELO, 2006b). As células remanescentes se reorganizam e, em 48 horas, transformam-se em um saco alongado repleto de células germinativas. Esse saco é o esporocisto. As células germinativas sofrem diferenciação e os esporocistos secundários migram para as regiões do hepatopâncreas e do ovotéstis dos moluscos. Os aglomerados celulares vão se diferenciando para formar as cercárias (REY, 1991).

A cercária é uma larva com corpo e cauda, adaptada à vida aquática que começa a deixar os moluscos entre 4 e 6 semanas após a infecção (GRYSEELS et al., 2006). As cercárias ganham os espaços sanguíneos que envolvem o hepatopâncreas e ovotéstis, encaminham-se pela corrente circulatória que envolve o intestino posterior (reto), formam minúsculas vesículas que se rompem, liberando-as para o meio exterior (REY, 1991). Na água as cercárias têm fototropismo positivo ficando na superfície em busca do hospedeiro definitivo por até 72 horas. Um molusco infectado por um miracídio pode liberar milhares de cercárias todos os dias durante meses (GRYSEELS et al., 2006).

Na pele do homem, a penetração é consumada pela ação lítica e pela ação mecânica devido aos movimentos intensos da larva. Quando atravessa a pele, a cercaria perde a cauda e passa a esquistossômulo (REY, 1991).

Os esquistossômulos são adaptados ao meio interno isotônico do hospedeiro definitivo e penetram em seus vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos. Muitos deles são vencidos pelo sistema imunológico humano e os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões e, posteriormente, migram para o fígado, onde se alimentam e tornam-se adultos. O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (MILLER; WILSON, 1978). Um verme adulto vive em média de 3 a 5 , mas podem atingir até 30 anos (GRYSEELS et al., 2006).

### 1.3 Diagnóstico da esquistossomose

#### 1.3.1 Humanos

A técnica parasitológica de Kato-Katz é o método padrão-ouro para o diagnóstico de esquistossomose mansônica. Esse método direto e quantitativo identifica a presença de ovos do parasito nas fezes de pacientes infectados (KATZ et al., 1972).

Tal método apresenta vantagens pela sua praticidade e relativo baixo custo de realização, além de bom desempenho no diagnóstico de infecções com alta carga parasitária. No entanto, a sensibilidade da técnica diminui quando a prevalência e intensidade da doença são baixas (EBRAIN et al., 1997). Em infecções onde o número de ovos liberados é menor que 100 ovos do parasito por grama de fezes, a técnica pode subestimar o diagnóstico (MELO et al., 2006a). Dessa forma, a sensibilidade do método de Kato-Katz depende diretamente da quantidade de ovos eliminados pelo portador (BARRETO et al., 1990; ENGELS et al., 1996). Ainda, a sensibilidade da técnica pode ser reduzida também devido às flutuações diárias na excreção de ovos e a distribuição não uniforme dos ovos nas fezes (ENGELS et al., 1996). Os problemas inerentes à detecção de ovos de *Schistosoma* nas fezes



tornam-se particularmente importantes diante de baixas intensidades de infecção, como ocorre em áreas de baixa transmissão e nas fases crônicas da infecção (HAMILTON et al., 1998).

O diagnóstico imunológico da esquistossomose pode ser feito com várias técnicas classificadas em duas categorias: detecção de anticorpos ou antígenos circulantes. Ensaios para a detecção de anticorpos específicos circulantes contra soluble egg antigen (SEA) e soluble worm antigenic preparation (SWAP), por exemplo, têm mostrado maior sensibilidade que o exame parasitológico em áreas de baixa endemicidade (NOYA et al., 2002). No entanto, apresentam deficiência na especificidade, havendo possibilidade de reação cruzada com nematódos intestinais (COLMENARES et al., 1993). A especificidade próxima a 100% é a vantagem que a detecção de antígenos circulantes como as glicoproteínas antígeno circulante anódico (CAA) e o antígeno circulante catódico (CCA), respectivamente derivadas do epitélio intestinal do parasito, oferece em relação à pesquisa de anticorpos, mas as desvantagens incluem a baixa sensibilidade em infecções de baixa intensidade, alto custo, abordagem mais sofisticada e a dependência de anticorpos monoclonais (RABELLO et al., 2002).

Os testes sorológicos podem ser bastante úteis, particularmente em regiões com baixa prevalência e no diagnóstico de viajantes e turistas após passagem por áreas endêmicas para esquistossomose (MELO et al., 2006a).

### 1.3.2 Moluscos vetores infectados

Para que se possa identificar uma coleção de água (criadouro de *Biomphalaria*) como foco de transmissão é necessária a detecção de infecção em moluscos. No ciclo natural, o molusco infectado pelo *S. mansoni* começa a eliminar cercárias a partir do trigésimo dia de infecção (BARBOSA; SILVA, 1992). Tradicionalmente, a identificação de moluscos infectados consiste em duas técnicas: através da exposição do molusco à luz, em recipientes com água, observando-se, uma hora depois, se ocorre a eliminação de cercárias (KUNTZ, 1946), e a segunda identifica moluscos infectados após esmagamento dos mesmos para observação de

esporocistos, ambas executada individualmente em cada molusco (DESLANDES, 1951).

As duas técnicas descritas acima são simples e de baixo custo laboratorial, no entanto com alta demanda operacional, uma vez que são necessárias várias viagens aos focos para que se obtenha moluscos infectados. Além disso, há uma mortalidade notável de moluscos entre o momento da coleta no campo e a análise no setor de malacologia. Aliado a isso existe a dificuldade em manter esses moluscos em condições adequadas para que sobrevivam e possam ser analisados quanto a liberação de cercárias. Todo o processo requer pessoal especializado, condições de manutenção dos moluscos e tempo para que a análise possa ser feita individualmente em cada molusco. Como mostra Barbosa (1992), em várias coletas de campo durante um ano foram capturados 8300 *B. straminea* e após serem analisados, não foi encontrado nenhum que eliminasse cercárias de *S. mansoni*. Essa coleta foi realizada em uma região onde a prevalência humana para esquistossomose era de 92% e só havia *B. straminea* (BARBOSA; SILVA, 1992).

Fica claro que os métodos convencionais de identificação de focos de transmissão apresentam limitações, particularmente quando o vetor envolvido é o *B. straminea*.

### 1.3.3 Coleções de água infectadas

O risco de infecção em sítios de transmissão da esquistossomose pode ser estimado pela detecção de moluscos infectados capazes de liberar cercárias.

Informações sobre a infecção dos moluscos e distribuição de cercárias são necessárias para avaliação do risco de infecção. No entanto, a influência das flutuações sazonais na densidade dos vetores, qualidade das coleções de água coletadas (muitas provenientes de valas e esgotos) e as diferenças na competência e capacidade vetoriais são alguns dos fatores que dificultam a identificação de focos de transmissão da doença através da análise da água (HAMBURGER et al., 1998b). Além disso, os métodos de coleta não são apropriados para o uso em grande escala e a identificação e diferenciação morfológica das espécies de cercárias de outros parasitas não é possível de ser realizada. Em áreas endêmicas onde outros

parasitos aparecem junto ao *S. mansoni* e dividem o mesmo local de transmissão, a identificação das espécies é freqüentemente necessária (ABATH et al., 2006a).

#### 1.4 Detecção molecular do *Schistosoma mansoni*

##### 1.4.1 “Polymerase Chain Reaction” – PCR

Os estudos moleculares são responsáveis por grande parte dos avanços na pesquisa em esquistossomose. O conhecimento do genoma, do proteoma, transcriptoma, “orfeoma”, “glicoma” e imunoma do *Schistosoma* são/serão fundamentais para o entendimento, por exemplo, da regulação da expressão gênica do parasito em suas diferentes fases de vida. O prognóstico para as descobertas através desses métodos é promissor, sendo as limitações principalmente de caráter técnico (WILSON, 2006). Esses estudos genômicos e pós-genômicos contribuem enormemente com informações para a descoberta de novos alvos para drogas e vacinas, além de funções imunomoduladoras que podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos agentes anti-esquistossômicos (HOKKE et al., 2007).

A possibilidade de amplificação e detecção de ácidos nucleicos levou a mudanças nos métodos convencionais laboratoriais baseados em expressão fenotípica de antígenos ou produtos bioquímicos (GOMES et al., 2006).

A PCR é uma técnica de amplificação extremamente sensível e específica capaz de detectar um único fragmento de DNA em uma amostra, desde que pelo menos uma das margens da seqüência a ser amplificada seja conhecida e que o fragmento esteja presente na amostra. A detecção de seqüências específicas de DNA por PCR tem confirmado ser de extremo valor para a análise genética e diagnóstico de várias doenças patogênicas infecciosas (ABATH et al., 2006a).

A PCR é uma reação enzimática que se baseia nas seguintes propriedades: a) do DNA em ter a estrutura de dupla hélice desfeita quando aquecidas a temperaturas acima de 85°C, ficando as duas fitas separadas, b) no princípio da complementariedade entre as bases nucleotídicas Adenina = Timina e Guanina =

Citocina e c) utiliza a enzima termoestável Taq DNA-polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (ALBERTS et al., 1997; EISENSTEIN, 1990).

Para que a reação possa ocorrer são necessários os seguintes reagentes: 1) tampão específico para PCR, 2) co-fatores para a enzima,  $MgCl_2$ , por exemplo, 3) a enzima termoestável, 4) a seqüência específica de DNA a ser amplificada, 5) os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 6) duas seqüências de oligonucleotídeos de até 30 pb que serão os iniciadores, sintetizados para serem complementares à seqüência a ser amplificada (ALBERTS et al., 1997; EISENSTEIN, 1990; MELO, 2006b).

A técnica se desenvolve através de ciclos de 3 etapas fundamentais: a) aquecimento para separação das fitas de DNA - fase de desnaturação; b) resfriamento na presença dos dois iniciadores (ou pelo menos um) para que a hibridização dos oligonucleotídeos com as seqüências de DNA complementares possa ocorrer - fase de anelamento e, finalmente, c) a incubação da mistura anelada com a enzima polimerase e as quatro bases nucleotídicas – fase de síntese (Figura 2) (EISENSTEIN, 1990). Por se tratar de uma reação enzimática cíclica, os novos fragmentos sintetizados servem de molde e, depois de poucos ciclos, o produto predominante é um fragmento de DNA de uma única espécie molecular, cuja extensão corresponde a distância entre os dois iniciadores originais (ALBERTS et al., 1997). A amplificação gera produtos em progressão geométrica de modo que são produzidos mais de um milhão de cópias do DNA alvo. Isso permite que a partir de uma quantidade mínima de alvo possa ser gerado grandes quantidades de seqüências amplificadas (MELO 2006b, TAYLOR et al., 1993).

A reação de PCR é uma seqüência de 20 a 40 repetições cíclicas, com utilização de um par de iniciadores e capacidade de detecção de até 1 pg de DNA alvo (ABATH et al., 2002; ALBERTS et al., 1997).

#### 1.4.1.1 Nested PCR (NPCR) e Single Tube Nested PCR (STNPCR)

A NPCR é uma variação da PCR onde ocorrem duas reações de amplificação simples consecutivas. O produto de amplificação gerado na primeira PCR serve de molde para a segunda reação. Na primeira etapa, um fragmento de DNA será

amplificado e essa seqüência será o alvo para a amplificação na etapa consecutiva. Na segunda PCR, um novo par de iniciadores que anelam internamente ao fragmento previamente amplificado, amplifica uma seqüência alvo interna à primeira seqüência, que pode ou não se sobrepor a uma das terminações finais do primeiro produto. A NPCR tem capacidade de detectar até 0,1 fg sendo mais sensível e específica do que a PCR. Isso ocorre devido a segunda amplificação o que a torna indicada para a detecção de alvos que aparecem no DNA em poucos números de cópias (ABATH et al., 2002; MELO. 2006b; PINGON et al., 1990.).

A NPCR é mais sensível do que a PCR, no entanto a necessidade de abertura dos tubos depois da primeira reação e transferência do produto para outro tubo com iniciadores diferentes para que ocorra a segunda reação aumenta o risco de contaminação cruzada das amostras negativas favorecendo ao aparecimento de resultados falso-positivos (ABATH et al., 2002). Por essa razão a STNPCR foi desenvolvida para que fosse mais sensível do que a PCR, porém com o risco de contaminação cruzada diminuído.

A STNPCR é também uma variação da reação de PCR onde ocorrem duas amplificações consecutivas. Diferentemente da NPCR, a STNPCR foi desenvolvida para que os tubos não precisassem ser abertos entre as duas amplificações. Dois princípios foram utilizados no desenvolvimento da STNPCR: a) o uso de temperaturas de anelamento distintas para os iniciadores externos dos internos e b) separação física dos iniciadores internos dos reagentes da primeira reação.

O uso de diferentes abordagens de PCR para o diagnóstico de agentes infecciosos é feito por numerosos grupos de pesquisas. Na esquistossomose, o estudo de Hanelt et al. (1997) utilizaram como alvo a região 18S rDNA do *S. mansoni* em NPCR para estudo em *B. alexandrina*. Hamburger et al. (1998a) desenvolveram uma PCR tendo como alvo seqüências altamente repetitivas *in tandem* do genoma do *S. mansoni* para identificar infecções pré-patentes (menos de 30 dias de infecção, período em que o molusco, apesar de infectado, não libera cercárias) em *B. glabrata*. Jannotti-Passos et al. (1997) utilizaram a região de repetição de mini-satélite do DNA mitocondrial do *S. mansoni* como alvo para sistema de PCR multiplex para identificar infecção em *B. glabrata*. Jannotti-Passos et al. (2006) apresentaram uma PCR multiplex que identifica o DNA de *S. mansoni* tendo como alvo a região ITS2-rDNA (seqüência intergênica transcrita) e também diferencia as três espécies de *Biomphalaria* que são consideradas hospedeiras

intermediário no Brasil (*B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*). Finalmente, em Caldeira et al. (2004) são mostrados a identificação de moluscos *Biomphalaria* infectados com DNA de *S. mansoni* tendo como alvo também a região ITS2-rDNA do parasito em PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e LS-PCR (*low stringency*).

Esses são alguns exemplos de trabalhos que utilizam a detecção do DNA do *S. mansoni* no diagnóstico da esquistossomose, dentre os quais estão aqueles desenvolvidos na tentativa de identificar focos de transmissão da doença a partir da detecção molecular do parasito em algumas espécies de moluscos vetores. No entanto, nenhum desses trabalhos sugere estratégias que possam ser utilizadas em larga escala (ABATH et al., 2006).

#### 1.4.1.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é um refinamento da PCR desenvolvida por Mullis e Faloona em 1987. Higuchi et al. (1992) foram os pioneiros na análise da cinética da reação de PCR através da construção de um sistema que detecta os produtos de PCR no momento em que são gerados baseados na tecnologia de fluorescência (ZIPPER et al., 2004).

Na qPCR o produto gerado durante a reação é monitorado no momento de sua formação através do acompanhamento da fluorescência de corantes ou sondas. O uso de corantes clássicos como o brometo de etídio, no entanto, interferem na reação de polimerase (KUBISTA et al., 2006). Por isso, corantes assimétricos de cianina como o SYBR Green I que apresenta seletividade, alta sensibilidade por fita dupla de DNA, capacidade de fluorescência quando excitado com luz ultravioleta além de estabilidade térmica (ZIPPER et al., 2004) tornou a qPCR um processo capaz de ser acompanhado no momento em que acontece.

A diferença entre a fluorescência emitida quando o corante está livre (que corresponde ao basal da reação) e quando está ligado a uma fita dupla de DNA reflete a quantidade de produto gerado (KUBISTA et al., 2006; ZIPPER et al., 2004). No caso do SYBR Green I essa diferença é de 100 vezes aproximadamente (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). Na prática, durante os ciclos iniciais de

amplificação o sinal de fluorescência gerado é fraco e não pode ser distinguido da fluorescência basal. No entanto, com o acúmulo de produtos gerado na PCR (fita dupla de DNA) o sinal emitido cresce exponencialmente (KUBISTA et al., 2006).

A reação convencional de PCR é do tipo *end point*, ou seja, o resultado gerado só pode ser analisado ao final da reação. Nesse tipo de PCR o resultado não informa nada sobre a quantidade inicial dos alvos presentes na amostra permitindo apenas a distinção entre amostras positivas e negativas. Por outro lado, as curvas geradas na qPCR são separadas na fase de crescimento exponencial das reações. A diferença na quantificação é que a qPCR compara o número de ciclos de amplificação necessário para cada amostra atingir um nível de fluorescência enquanto a PCR detecta apenas o produto final da reação. O número de ciclos necessários para atingir esse nível é chamado de valor de *cycle threshold*, Ct no ABI Prism® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ou *crossing point* na literatura do LightCycler® - Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA (KUBISTA et al., 2006; WONG; MEDRANO, 2005).

Considerando que a PCR é uma reação enzimática do tipo exponencial, o valor de Ct normalmente é determinado na região 2/3 da fase de crescimento exponencial da amplificação enquanto que na PCR o resultado analisado corresponde a fase platô da reação (Figura 3). Para determinação do valor de Ct deve ser observado os valores dos desvios padrões das duplicatas, quanto menor o desvio, melhor o valor do Ct.

A afinidade por fita dupla de DNA do SYBR Green I faz com que ocorra emissão de fluorescência na presença de qualquer dupla fita de DNA. A formação de dímeros de iniciadores interfere na formação de produtos específicos da PCR porque há competição por reagentes e isso pode levar a erro de leitura do gráfico fornecido durante a resposta da reação (KUBISTA et al., 2006). Por isso, em sistema de qPCR onde há a utilização do SYBR Green I, uma maneira de realizar a análise da formação de dímeros é através da curva de dissociação (*melting curve*).

A curva de dissociação é construída logo após o término da reação de PCR. A temperatura cresce gradualmente e a fluorescência é medida de acordo com cada temperatura. Quando a temperatura atingida é a necessária para separar a fita dupla de DNA, o corante é liberado e a fluorescência cai abruptamente (Figura 4). Esta temperatura é conhecida como *melting temperature*, ou Tm. Como os produtos de dímeros de iniciadores são normalmente menores do que os produtos

específicos, nesse caso a  $T_m$  será menor. Dessa forma, a partir da análise do gráfico que apresenta as curvas de dissociação podem ser facilmente diferenciados os produtos de dímeros de iniciadores, dos produtos específicos (KUBISTA et al., 2006).

A qPCR apresenta importantes vantagens quando comparada com a PCR que justificam o desenvolvimento e validação de um sistema para a detecção do DNA do *S. mansoni*. Entre elas, a quantificação é uma importante propriedade principalmente quando utilizada no diagnóstico de doenças e também para a caracterização do risco de infectividade dos focos de transmissão e carga parasitária nos hospedeiros, a evidente diminuição no risco de contaminação uma vez que não é necessário a manipulação de produtos de PCR para visualização em corrida eletroforética em gel e a sensibilidade ao menos 1000 vezes superior aos ensaios de hibridização e PCR (ABATH, 2006b; GOMES et al., 2006; WONG; MEDRANO, 2005).

Apesar da qPCR ser uma modalidade recente na biologia molecular, é grande sua aceitação pela comunidade científica sendo muito expressivo o número de trabalhos publicados que envolvem a técnica. A necessidade de conhecimento específico para análise dos dados e dependência de equipamentos e reagentes de alto custo é uma fator limitante para o uso da qPCR em rotina de grande escala. Porém, nos últimos 10 anos os preços estão diminuindo e a discussão de custo perde a relevância em virtude dos grandes avanços obtidos através do método molecular (MELO et al., 2006a). Tendo como exemplo o diagnóstico de dengue que é feito rotineiramente em todo o mundo através de RT-PCR (GOMES et al., 2007).

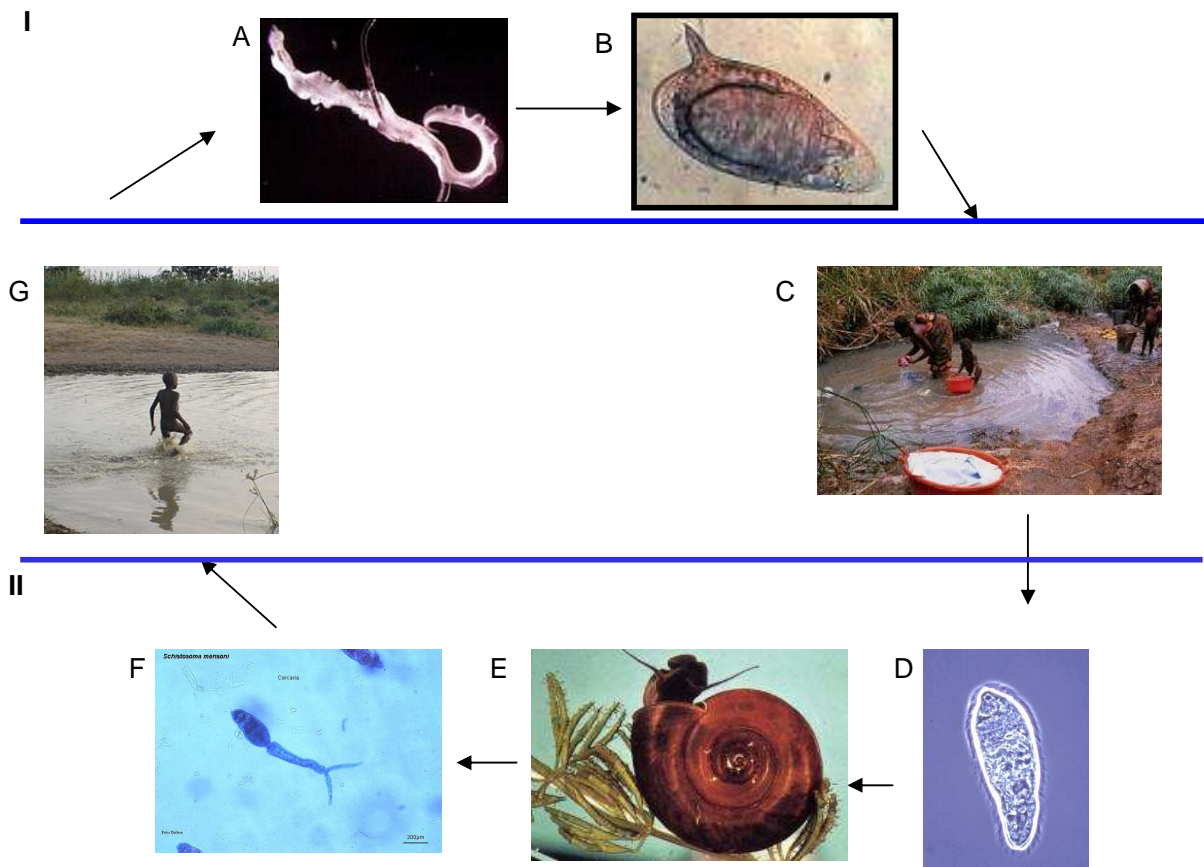
Recentemente a qPCR foi desenvolvida para a quantificação do número de organismos infecciosos (GOMES et al., 2006). Na virologia a qPCR tem sido aplicada para testes de resistência, tipagem e quantificação viral e genotipagem.

Na bacteriologia, parasitologia e micologia os principais estudos são desenvolvidos na tentativa de se obter diagnósticos precisos e rápidos. Agentes infecciosos tais como: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Neisseria meningitidis*, respiratory viruses (tais como influenza virus, respiratory syncytial virus, SARS-CoV, avian influenza vírus, HIV, hepatitis B, hepatitis C, parainfluenza virus, adenovirus, rhinovirus), *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jiroveci*, *Aspergillus spp.* (SPEERS, 2006)



são alguns exemplos que já apresentam ferramentas moleculares para o diagnóstico.

O sistema de qPCR desenvolvido para a detecção molecular de *S. mansoni* é pioneiro na literatura e mostra potencial para a quantificação de carga parasitária em infecções humanas e monitoramento de sítios de transmissão através da detecção e quantificação do DNA do parasito em moluscos vetores (GOMES et al., 2006).



**Figura 1 - Ciclo Evolutivo do *Schistosoma mansoni*.**

Legenda: I – Fase que ocorre no hospedeiro definitivo, homem, por exemplo. II – Fase que ocorre em ambientes aquáticos e nos hospedeiros intermediários, moluscos vetores.

A - vermes adultos acasalados.

B - Ovo do parasito.

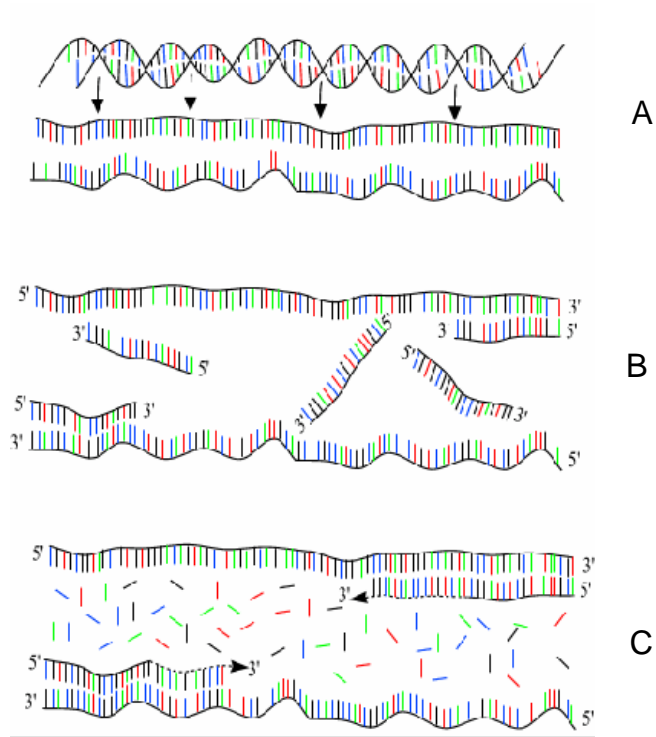
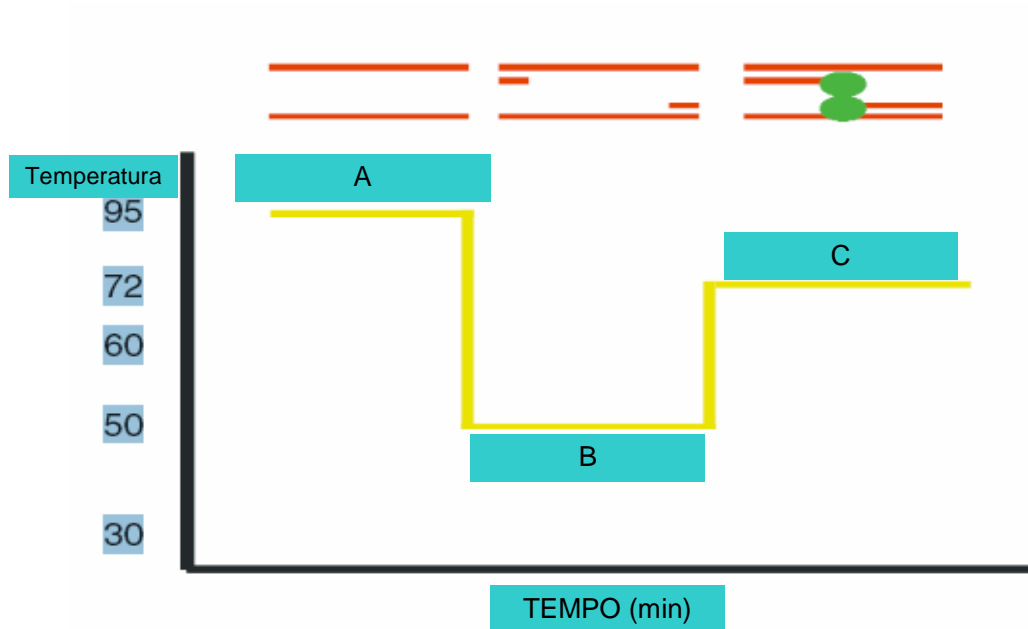
C - Coleção de água contaminada com fezes contendo ovos do parasito.

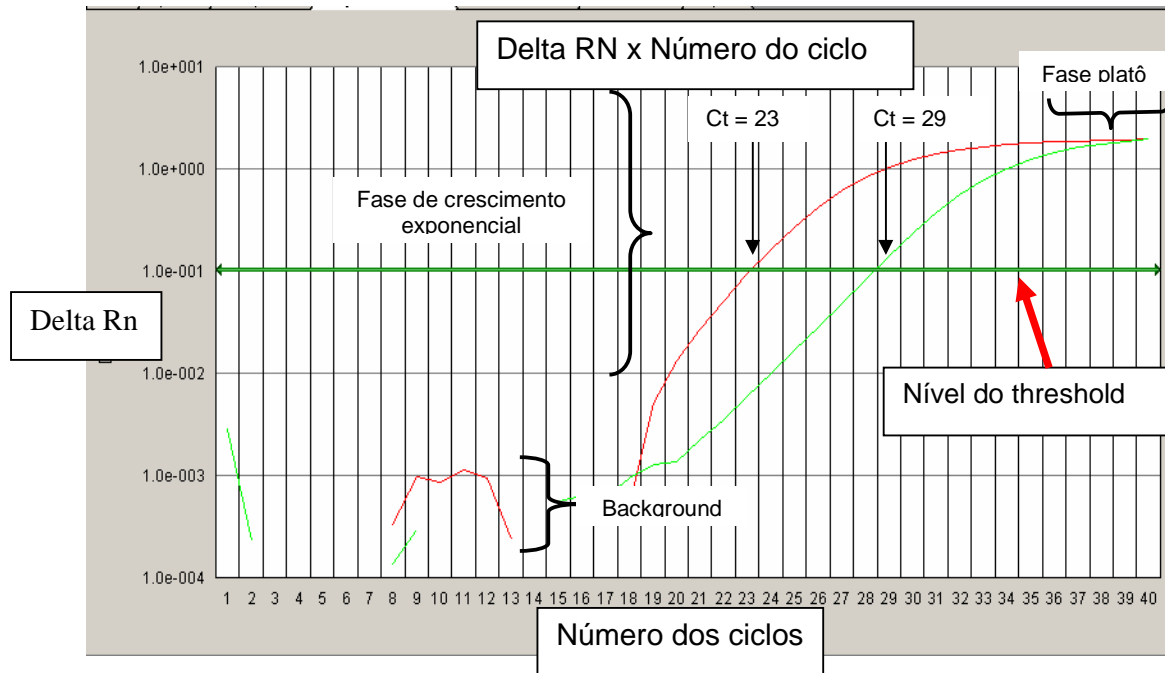
D – Miracídio.

E - Hospedeiro intermediário do gênero *Biomphalaria*.

F - Cercária.

G – Possível hospedeiro definitivo em coleção de água contaminada com cercárias.

**I****II****Figura 2 - Cinética da reação de PCR.**Legenda: Em **A** Fase de desnaturação, **B** Fase de anelamento e **C** Fase de síntese.



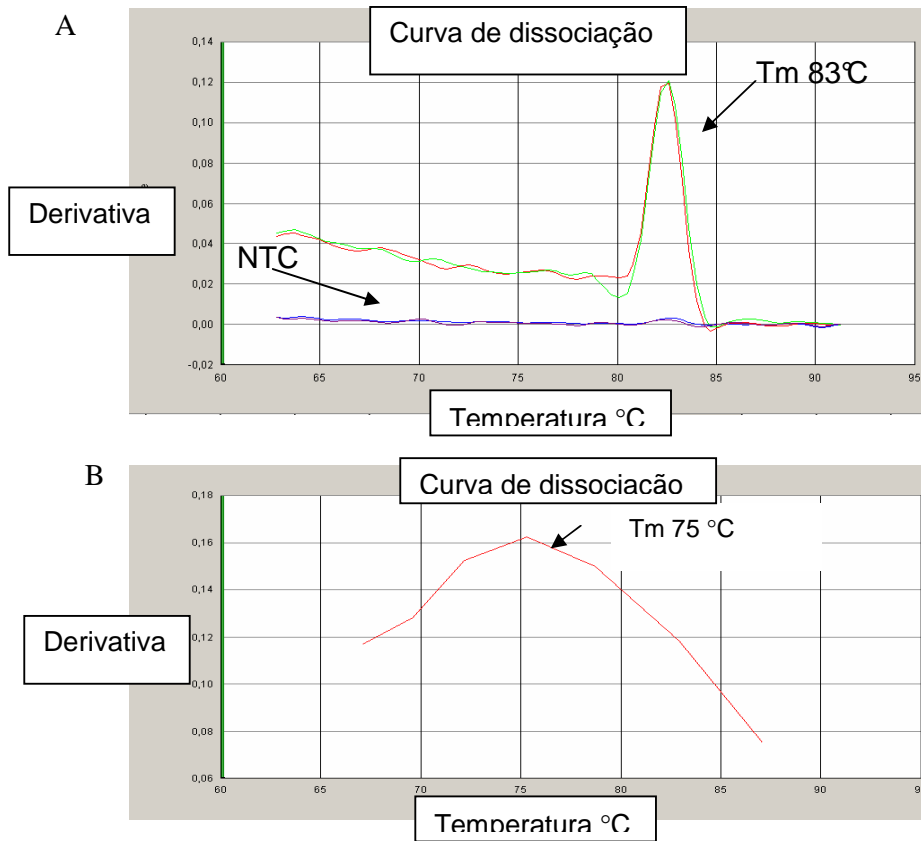
**Figura 3 - Curva de amplificação originada a partir da qPCR.**

Legenda: O nível do threshold está suficientemente acima do background e o número de ciclos necessários para atingir cada threshold, Ct, são demonstrados.

Delta Rn – diferença entre o sinal de fluorescência inicial (Rn0) e final (Rn1)

Cycler number – número do ciclo

Ct – cycler threshold



**Figura 4 - Curvas de dissociação.**

Legenda: **A** - curva de dissociação mostrando a Tm de 83°C que corresponde a um produto específico e as amostras negativas ("no template control" -NTC).

**B** - curva de dissociação correspondente ao produto de dímeros de iniciadores.

## 2 JUSTIFICATIVA

A identificação de coleções de água com moluscos infectados pelo *Schistosoma* é de grande interesse para a saúde pública uma vez que representam focos de transmissão da doença. É essencial que se disponha de métodos diagnósticos acurados, quantitativos, específicos e sensíveis, capazes de serem utilizados em grande escala, como são os testes baseados na detecção de DNA.

A abordagem usualmente utilizada como padrão-ouro para identificar moluscos infectados – exposição dos moluscos à luz (KUNTZ, 1946) apresenta limitações, tais como: possibilidade de resultados falso-negativos, particularmente em infecções pré-patentes ou seja, com menos de 30 dias de infecção, período em que o molusco, apesar de infectado, não libera cercárias. Além disso, existe a possibilidade de morte do molusco antes de ser analisado; a demanda operacional de procedimentos de campo e laboratório, e a dificuldade na identificação de *B. straminea* contaminado, uma vez que essa espécie libera, poucas cercárias, diferentemente do *B. glabrata*, a outra espécie de molusco vetor relevante no nordeste brasileiro. Dessa forma, as limitações da técnica padrão-ouro fazem com que os métodos moleculares sejam vistos como possíveis alternativas na identificação de focos de infecção através da detecção de DNA do *S. mansoni* em lotes de moluscos vetores.

A aplicação da PCR para a detecção molecular do *S. mansoni* é rara, apesar da recomendação da Organização Mundial de Saúde de que o foco nas pesquisas para esquistossomose devem se concentrar no desenvolvimento e validação de novas estratégias e ferramentas para o controle da doença (Organização Mundial de Saúde, 2006).

Nesse contexto, alguns trabalhos foram publicados para a detecção do parasito em moluscos (CALDEIRA et al., 2004; JANNOTTI-PASSOS et al., 1997; 2006; HAMBURGER et al., 1998a; HANELT et al., 1997a; MELO et al., 2006a), monitoramento de cercárias em coleções de água (HAMBURGER et al., 1998b) e diagnóstico da infecção em humanos (PONTES et al., 2002; PONTES et al., 2003; RABELLO et al., 2002; SANDOVAL et al., 2006).

Diante do exposto, esse trabalho pretender identificar focos de transmissão da esquistossomose através da detecção do DNA do *S. mansoni* em lotes de

moluscos vetores utilizando PCR, NPCR, STNPCR e qPCR, na tentativa de oferecer uma ferramenta alternativa aos métodos convencionais de diagnóstico em moluscos vetores da esquistossomose, contribuindo para o sucesso do controle da doença. Nosso grupo de pesquisa, iniciado pelo Dr. Frederico Abath (CPqAM – FIOCRUZ/PE), já possui ampla experiência no uso de técnicas moleculares na detecção do DNA de *S. mansoni*, tendo em 2002 desenvolvido um sistema de STNPCR, com depósito de pedido de patente (ABATH et al., 2001) e validado em amostras de moluscos em Melo (2006a e 2006b). Além disso, em Gomes et al. (2006) desenvolvemos um sistema de qPCR também com outro depósito de pedido de patente (ABATH et al., 2006b), e que serviu como base para o desenvolvimento da presente dissertação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Desenvolver e validar a detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para a identificação de focos de transmissão.

#### 3.2 Específicos

- a) Estabelecer métodos adequados para purificação de DNA em lotes de moluscos;
- b) Desenvolver e validar um sistema de PCR quantitativa em tempo real;
- c) Determinar eficiência, especificidade e sensibilidade da qPCR;
- d) Determinar especificidade de sistemas de detecção molecular baseado em PCR simples, *nested* PCR – NPCR e PCR em único tubo – STNPCR;
- e) Testar as abordagens moleculares em lotes de moluscos (*B. glabrata* e *B. straminea*) coletados em vários focos de transmissão de esquistossomose;
- f) Comparar os resultados obtidos através da técnica de exposição à luz com as abordagens baseadas em PCR no diagnóstico de infecção em lotes de moluscos.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de estudo

Estudo experimental

### 4.2 Desenho dos iniciadores dos sistemas baseados em PCR

Para o desenho dos iniciadores empregados nesse estudo, foram utilizadas seqüências do SSU rRNA (pequena subunidade do RNA ribossomal) de *Schistosoma* sp, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Biomphalaria glabrata* e outros moluscos e outros trematódeos. O gene que codifica a subunidade pequena do RNA ribossomal (DNA r 18S) no genoma do *S. mansoni* foi selecionado como alvo para detecção através de PCR. Este gene está presente em cerca de 100 cópias por genoma haplóide e apresenta regiões conservadas e variáveis (JOHNSTON, 1993). Para a obtenção das seqüências alinhadas dos genes referentes ao rRNA 18S de *Schistosoma*; *B. glabrata*; *H. sapiens*, *M. musculus*, outros moluscos e de trematodos relacionados com o *S. mansoni*, foram utilizadas ferramentas disponíveis no Banco de dados *European ribosomal RNA database* mantido pelo Departamento de Sistema Vegetal da Universidade de Biologia de Gent (RUG), na Bélgica. Com o auxílio do software Primer Express 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram desenhados os iniciadores Schfo111 e Schre111 e também os iniciadores descritos em Melo et al., (2006): Schfo17, Schre19, Schfo11 e Unvre16. Também foram utilizados os iniciadores universais unvfo2 e unvre6 (Tabela 1). Uma atenção especial foi conferida à porção 3' terminal dos iniciadores devido ao fato de que a total complementariedade nos últimos 5 nucleotídeos dos iniciadores com a seqüência alvo é essencial para que a enzima *Taq* polimerase possa iniciar corretamente a síntese da fita complementar (GOMES et

al., 2006). Os seguintes parâmetros físico-químicos desejáveis nos iniciadores foram respeitados: ausência de formação de “hairpin” (*loop* na sequência do iniciador que pode ser ocasionado devido à presença de seqüências palindrômicas nos nucleotídeos), dímeros, baixa complementaridade interna e estrutura secundária ausente ou restrita. Suas seqüências, especificidades e características físico-químicas podem ser observadas na Tabela 1.

#### 4.3 Obtenção de DNA das amostras biológicas analisadas.

##### 4.3.1 DNA de *Schistosoma mansoni*

A cepa de *S. mansoni* BH é mantida rotineiramente no Laboratório de Esquistossomose (Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife-PE) em camundongos *outbred* albino e moluscos *B. glabrata*. Os camundongos foram infectados, por via percutânea, com aproximadamente 350 cercárias e os moluscos foram infectados por exposição 18 horas a 10 miracídios/ moluscos. Os vermes adultos foram obtidos através de perfusão hepática e então extraído o DNA (SMITHERS; TERRY; 1965).

##### 4.3.2 DNA de camundongos e humano

Para obtenção do DNA de camundongos mantidos no Biotério de Criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, utilizaram-se amostras de fígado destes animais. O DNA humano foi gentilmente doado pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pertencente ao Departamento de Imunologia do CPqAM.

#### 4.3.3 DNA de diferentes trematodos

As amostras de DNA de *Echinostoma paraensis*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma rhodaini*, *Cercaria minensis*, *Cercaria macrogranulosa* e *Cercaria caratinguensis* foram gentilmente cedidas por Arnaldo Maldonado (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro), Guilherme Oliveira e Omar Carvalho (Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte).

#### 4.3.4 DNA de lotes de moluscos do campo

Os moluscos utilizados para determinação do limite de detecção dos sistemas moleculares foram exemplares de *B. glabrata* provenientes do Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ.

As amostras de moluscos, utilizadas na validação da detecção molecular, foram coletadas em áreas endêmicas resultantes de trabalho colaborativo dos Departamentos de Imunologia e Parasitologia, ambos do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ, Recife-PE). A escolha das áreas para coleta dos moluscos vetores foi feita baseada em evidências epidemiológicas preliminares a partir de casos humanos positivos para esquistossomose identificados em localidades do Estado de Pernambuco. Foram analisados lotes de moluscos de duas espécies: *B. glabrata* e *B. straminea*. Os lotes foram coletados das regiões de Novo Caiará do município de São Lourenço da Mata (Figura 5), Sotave II do município de Jaboatão dos Guararapes (Figura 6) e Pau amarelo (Lagoa do Aruá) todos na zona da mata do Estado de Pernambuco, Nordeste brasileiro.

Após a coleta dos moluscos, os mesmos foram identificados e separados em lotes que variaram de 9 a 103 moluscos conforme a quantidade encontrada em cada foco identificado. No Laboratório de Esquistossomose do CPqAM os moluscos foram

armazenados em aquários com água e mantidos em condições ideais (temperatura, pH, salinidade). As espécimes foram analisadas através do método de exposição à luz (ver seção 4.7) pelos técnicos do Laboratório de Esquistossomose do CPqAM e em seguida encaminhados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do CPqAM. Os moluscos foram sacrificados através da imersão por 30 s em água fervente para a remoção das carapaças. Em seguida, foram excisadas as partes moles referentes à massa cefalopodal e ao componente visceral que incluía o hepatopâncreas e ovoteste (Figura 7). Este material biológico era mantido congelado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a extração de DNA.

#### 4.4 Análise do DNA

Para extração e purificação de DNA de moluscos vetores foram testados dois métodos: a) fenol-clorofórmio e, b) baseado em matriz de sílica descritos por Sambrook et al. (1989).

##### 4.4.1 Método fenol-clorofórmio

Esse método sofreu modificações que foram testadas e otimizadas de modo que fosse possível simplificar e reduzir o tempo necessário para a realização desse procedimento e que, ao final, fosse obtido DNA em condições apropriadas de detecção pelas abordagens moleculares. Condições tais como integridade do DNA, remoção de possíveis inibidores nas reações de PCRs (proteínas e sais) e principalmente quantidade suficiente para detecção (FLEKNA et al., 2007; WILSON, 1997). Outro importante aspecto para as modificações do método de fenol/clorofórmio foi a necessidade de algumas adaptações de escala, visto que o método foi descrito originalmente para quantidade inicial de tecido de até 0,2 mg e nesse trabalho foram

utilizados, em média, 10 g. Resumidamente, a amostra tecidual foi macerada, homogeneizada e ressuspensa em solução de lise (NaCl 100 mM; TrisCl 10 mM, pH 8; SDS 0,5%; Proteinase K 20 mg/ml) na proporção de 1,2 ml/g de tecido e incubado a 60 °C durante 1 h; em seguida a amostra foi centrifugada a 4000 x g por 15 min. O sobrenadante foi submetido a purificação com seguidas extrações com fenol, sendo duas vezes com fenol/clorofórmio (1:1) e duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A cada etapa de extração o homogenato era centrifugado a 4000 x g por 7 min. Recupera o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensa em álcool isopropílico absoluto gelado e centrifugado a 4000 x g por 10 min. O “pellet” foi lavado uma vez com etanol a 70%, centrifugado e seco ao ar, durante 30 min. O sedimento foi ressuspensa em 1 ml de tampão TE (Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8 1mM), incubado durante 1h a 42 °C, e armazenado a -20 °C, para posterior quantificação (Figura 8). Para as reações de PCR foram utilizados 2 µl.

#### 4.4.2 Matriz caotrópica de sílica

As amostras (200 µL) foram expostas à sílica 10 mg/mL em solução saturada de iodeto de sódio 6 M ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,10 M, NaI 12 M,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0,03 M) centrifugado a 2000x g por 30 seg e desprezado o sobrenadante. O pellet foi lavado três vezes com a solução de lavagem (etanol 50%, NaCl 100 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 7,5 1mM,  $\text{H}_2\text{O}$ ), ressuspensa em 30 µL de tampão TE e colocado a 42°C por 20 mim. Após centrifugação a 2000x g por 30 seg o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado a -20°C.

Para a análise nos sistemas de PCR, 0,2% do volume das amostras purificadas foram analisadas. Na intenção de minimizar resultados falso-negativos devido a presença de inibidores, 2 µL das amostras foram testadas nas abordagens moleculares em diferentes diluições (1:10, 1:100, 1:1000 e sem diluição) sendo 1:10 e 1:100 as diluições com menor probabilidade de resultados falso-negativos, por diluir os inibidores sem prejudicar na detecção do alvo específico (MELO, et al., 2006a).

Quando as amostras foram negativas para as detecções moleculares com os sistemas específicos estas foram submetidas à PCR utilizando iniciadores universais para confirmar e evitar possíveis resultados falso-negativos devido à presença de inibidores.

#### 4.4.3 Método utilizando “Genomic Prep Cells and Tissue Isolation Kit” (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

A extração e purificação do DNA humano, de camundongo e também das amostras de vermes adultos de *Schistosoma* e de outros trematódeos, foi realizada com o kit comercial “Genomic Prep Cells and Tissue Isolation Kit” (Amersham Pharmacia Biotech, USA), seguindo-se as instruções do fornecedor. Resumidamente, 10 a 20 mg de tecido foram macerados, homogeneizados e tratados com 600 µl da solução de lise em microtubo Eppendorf de 1,5 ml, e incubados a 65 °C por 15 min. Após a incubação, os lisados foram misturados com 200 µl da solução de precipitação de proteína, homogeneizados por 20 s e centrifugados a 5000 x g por 3 min. Os sobrenadantes foram transferidos para um microtubo contendo 600 µl de isopropanol a 100% e, em seguida, centrifugados com a 5000 x g por 1 min, sendo os sobrenadantes descartados e os sedimentos contendo DNA ressuspendidos em 50 µl de água ultrapurificada Tipo 1 pela American Society for Testing and Materials (ASTM).

Os DNAs humano, camundongo, moluscos e de outros trematódeos foram utilizados no estudo da especificidade dos sistemas moleculares enquanto o DNA genômico de *S. mansoni* foi utilizado para o estudo e determinação do limite de detecção das PCRs .

#### 4.4.4 Quantificação do DNA.

As amostras de DNA extraído foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 2mM), e corados com brometo de etídio (10 mg/mL), com a finalidade de verificar a integridade e a qualidade da amostra.

A quantificação do DNA foi realizada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro, DU-65, Beckman instruments INC, UV/VIS, Glenrothes, Scotland e Bio-Rad, Model 3550, microplate Reader, E.U. A) com leituras a 260 e 280 nm. Após a quantificação o DNA foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

#### 4.5 Clonagem e seqüenciamento dos amplicons

A importância de se produzir amplicons alvo clonados é ter sempre padrões disponíveis, ao contrário da utilização do DNA genômico que necessita de uma fonte (verme adulto, cercária, ovo etc ) para extração.

Amplicons de 941 pb foram gerados por PCR (seção 4.8) utilizando os iniciadores Schfo 11 e Unvre 16. Esses amplicons foram purificados com o uso do kit Sephaglas BandPrep (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), seguindo orientações do fabricante e quantificados a partir de corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Essa quantificação foi realizada utilizando o software Molecular Imagin Software v 40.0 Kodak® e o padrão de peso molecular DNA High Mass (Invitrogen ®). Como comparação de quantificação também foi feita a leitura em espectrofotômetro (vide seção 4.4.4).

Cerca de 80 ng dos amplicons quantificados foram clonados no vetor pCR4-TOPO (Invitrogen ®) e utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli*, quimicamente competentes (one shot DU5 alfa TOP 10 - Invitrogen ®), seguindo as indicações do fabricante. Cinquenta microlitros da solução de células de *E. coli* mais

meio SOC foram plaqueados em 500 mL de meio LB enriquecidos com ampicilina (100 µg/ mL) a 37 °C por 18 horas. O vetor pCR4-TOPO permite a seleção direta de colônias recombinantes através da interrupção do gene letal de *E. coli ccdB* que é fusionado a porção C terminal do fragmento *LacZα*. A ligação com produtos de PCR interrompe a expressão da fusão dos genes *LacZα-ccdB* permitindo o crescimento apenas das colônias recombinantes transformantes das células TOP 10 (INVITROGEN, 2006). Desse modo, dentre as colônias crescidas algumas foram marcadas para posterior subclonagem e parte delas submetidas a reações de PCR para a verificação do inserto.

A PCR realizada utilizou os iniciadores Schfo11 e Unvre16 seguindo as mesmas concentrações citadas na seção 4.8 com 25 repetições (desnaturação a 94 °C, anelamento a 55 °C e extensão a 72 °C por 1 minuto cada etapa). Depois de verificada em corrida eletroforética em gel de agarose 1% a presença do inserto (941 pb) no vetor (3956 pb), parte das colônias foram armazenadas em meio LB + glicerol (1/1) a -70 °C e outra parte subclonada em meio LB + ampicilina (100 µg/ mL) 1/250.

O DNA plasmidial (vetor + inserto) foi purificado utilizando o kit Sephaglass FlexiPrep (Amersham Pharmacia Biotech, USA), seguindo orientações do fabricante, confirmado o tamanho do fragmento em corrida eletroforética em gel de agarose 1%, dosado espectrofotometricamente (ver seção 4.4) e armazenado a -20 °C para ser utilizado como controle padrão nas reações de PCR.

O seqüenciamento foi realizado para confirmação da seqüência do fragmento clonado utilizando 10 ng de amplicon e 3,2 pmol de cada iniciador (Schfo11 e Unvre16) em seqüenciador de 16 capilares ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA). A PCR para o seqüenciamento baseou-se no método Dideoxi de Sanger (SANGER et al., 1997) com a utilização do kit para seqüenciamento BigDye Terminator vs 3.0 (Applied Biosystems, CA, USA) seguindo as indicações do fabricante.

A análise das seqüências foi realizada através da comparação com as seqüências do banco de dados do NCBI, através do programa de alinhamento BLASTn (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2007).



#### 4.6 Quantificação dos amplicons

Utilizando-se da relação entre o tamanho de um fragmento e sua massa é possível quantificar o número de cópias de alvo tendo por base que  $10^{12}$  mol de 1 par de base  $\cong$  0,65 ng, que o genoma haplóide do *Schistosoma* segundo estimativas tem  $2,7 \times 10^8$  pb (LO VERDE et al., 2004) e que o gene-alvo se repete 100 vezes no genoma haplóide do parasito (JOHNSTON et al., 1993). Em conseqüência, 1 mol do genoma do parasito tem aproximadamente  $1,75 \times 10^{20}$  ng e  $6,02 \times 10^{23}$  genomas. Essa quantificação foi realizada pelo endereço eletrônico molbiol.edu.ru/eng. Por exemplo, o tamanho do fragmento clonado foi 0,940 kb e a quantidade de amplicon purificado 66,5 ng/ $\mu$ L. O valor encontrado foi de  $6,5 \times 10^{10}$  moléculas/ $\mu$ L.

As amostras de amplicons quantificados, purificados e clonados foram armazenadas a  $-20$  °C. Esses amplicons foram utilizados como padrões em número de cópias de alvo para determinação do limite de detecção da PCR em tempo real e também na quantificação de amostras testadas.

#### 4.7 Diagnóstico de infecção em moluscos pela indução de liberação de cercarias (Padrão-ouro).

As análises através do método convencional por exposição dos moluscos à luz (KUNTZ, 1946) considerado padrão-ouro foram feitas pelos técnicos do laboratório de Esquistossomose do CPqAM. Resumidamente, os moluscos foram mantidos individualmente em cubas com água decolorificada e expostos a luz artificial por 1 h (Figura. 9). A quantificação da liberação de cercárias era determinada microscopicamente (BARBOSA, 1992).

#### 4.8 Reações de PCR

Os iniciadores para os sistemas de PCR Schfo 11, Schfo 17 e Schre 19 foram desenvolvidos e otimizados durante a tese de doutoramento de Fábio L. Melo e estão descritos em Melo (2006b). As reações de PCR, NPCR e STNPCR foram realizadas no termociclador Termocycler gradient Eppendorf.

Os pares de iniciadores Schfo11 e Unvre16 (fragmento amplificado de 940 pb) e Unvfo2 e Unvre6 (fragmento amplificado de 800 pb) utilizam o protocolo de 30 ciclos (desnaturação a 92 °C por 30 s, anelamento a 65 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min). A ciclagem é precedida por uma etapa de desnaturação a 92 °C por 5 min, havendo uma extensão a 72 °C de 5 min ao final. Quando utilizados dos pares de iniciadores Schfo17-Schre19 (fragmentos amplificados de 720 pb) e Unvfo2-Unvre6, as condições de ciclagem são as mesmas descritas acima, exceto pela temperatura de anelamento, de 58 °C. As misturas das duas reações de amplificação eram compostas de KCl 50 mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA), 50 pmol de cada iniciador e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, em um volume final de 50 µl.

#### 4.9 *Nested* PCR em duas etapas (NPCR)

Foram utilizados dois pares de iniciadores em duas reações seqüenciais, em tubos diferentes, em um total de 60 ciclos (30 ciclos cada). Na primeira reação, Schfo11 e Unvre16 foram utilizados como iniciadores externos, enquanto que na segunda reação, uma alíquota do produto amplificado da PCR (2 µl) serviu como molde para uma nova amplificação utilizando iniciadores (Schfo17 e Schre19) que anelam em regiões internas ao amplicon produzido na primeira reação. Para que os amplicons gerados na primeira reação de PCR fossem introduzidos na segunda, havia necessidade de abrir o tubo da primeira reação. As misturas das reações de

amplificação consistiram em KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 50 pmol de cada primer e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase. Na 1<sup>o</sup> reação, a fase de desnaturação foi realizada a 92°C por 30 s, a de anelamento a 65°C por 1 min e a de extensão a 75°C por 1 min, em um total de 30 ciclos. Na segunda PCR as condições de ciclagem foram as mesmas, exceto pela temperatura de anelamento (58°C).

#### 4.10 *Nested* PCR em único tubo (“single tube nested PCR” – STNPCR)

O sistema de *nested* PCR em duas etapas com iniciadores imobilizados na tampa de tubos de reação foi desenvolvido e otimizado na tese de doutoramento de Fábio L. Melo e está descrito em Melo (2006b).

Dentre as abordagens de STNPCR foi utilizada a de separação física, onde os iniciadores internos são imobilizados por calor na fase interna do tubo de reação.

Os iniciadores internos Schfo17 e Schre19 foram imobilizados na superfície interna da tampa dos microtubos de reação, através da evaporação (em estufa a 37°C) em um volume de 10 µl contendo 50 pmoles de cada iniciador em azul de bromofenol 1µg/ml (Figura 10).

A primeira etapa da SNTPCR (com os iniciadores externos Schfo11 e Unvre16) consistiu em 15 ciclos, compostos por desnaturação (92 °C, por 30 seg), anelamento (65 °C, por 45 seg) e síntese (72 °C, por 1 min). Nesses primeiros ciclos a reação continha 0,1 pmol/µl de iniciadores externos em volume final de 50 µl, em Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,2 mM, (Amersham Pharmacia Biotech, USA) e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase.

Após o 15<sup>o</sup> ciclo de reação foi feita uma breve interrupção a 92 °C, para que fossem feitas repetidas inversões dos tubos, a fim de que os iniciadores internos entrassem em contato com a mistura reacional, passando a participar do segundo estágio da SNTPCR. A dissolução na mistura reacional podia ser visualizada pela coloração azulada devido ao azul de bromofenol.

O segundo estágio da STNPCR utilizou iniciadores internos e consistiu em 45 ciclos (92 °C por 30 seg, anelamento a 58 °C por 1 min e extensão a 75 °C por 1 min).

#### 4.11 PCR quantitativa em tempo real – qPCR

A qPCR foi realizada no termociclador ABI PRISM 7500 system (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando o corante fluorescente SYBR Green I e o fluoróforo ROX como referência passiva.

Foi escolhido o uso do corante SYBR Green I para as amplificações e ROX como corante fluorescente normalizador (não dependente de amplificação) por terem se tornado bastante populares para o diagnóstico de doenças parasitárias diante da enorme quantidade de publicações (KUBISTA et al., 2006; ZIPPER et al., 2004) e também devido aos custos serem menores quando comparado ao uso de sondas específicas (PONCHEL et al., 2003).

Os iniciadores Schfo111 e Schre111 foram desenhados, conforme descrito na seção 4.2 e amplificam um fragmento com 120 pb com temperatura de desnaturação ( $T_m$  - *melting temperature*) de 83°C. A análise da curva de dissociação realizada após a qPCR através da elevação da temperatura de forma gradativa de 60 para 95 °C (0,1 °C/seg) foi utilizada para confirmação da  $T_m$  dos produtos da PCR gerados. O *software* ABI PRISM (versão 1.4) foi usado para a análise e a interpretação dos resultados.

A concentração de utilização dos iniciadores foi otimizada através de ensaios de qPCR usando concentração de alvo constante (100 pg) e variação (40 a 2,5 µM) nas concentrações dos iniciadores. De acordo com os valores de Ct das amostras positivas e controles negativos (NTC) foi selecionado 2,5 µM (cada iniciador).

Os volumes 25 e 50 µL foram testados, sendo selecionado 50 µL de volume total de reação, pois dessa forma os possíveis inibidores da reação poderiam ser mais diluídos (RäDSTROM et al., 2004). As reações incluíram 2 µL do DNA extraído, iniciadores (2,5 µM), SYBR Green Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e H<sub>2</sub>O ultrapurificada tipo 1 segundo a ASTM adicionada de forma a completar um

volume final de 50  $\mu$ L. A qPCR foi realizada sob as seguintes condições de ciclagem: fase inicial de desnaturação à 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg). Diversas amostras negativas foram incluídos para a detecção de resultados falso-positivos pela PCR. Para a elaboração de uma curva padrão foram incluídos padrões quantitativos (DNA gênomico e cópias de amplicon, ver seção 4.12). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

#### 4.12 Determinação da eficiência, especificidade e limite de detecção da qPCR

Como a PCR é um processo exponencial, ela pode ser descrita pela equação a seguir:

$$N_n = N_0 + (1 + \varepsilon)^n$$

Onde:

$N_n$  representa o número de moléculas-alvo no ciclo  $n$ ;

$N_0$  é o número inicial de moléculas-alvo;

$\varepsilon$  significa a eficiência de amplificação, e

$n$  é o número de ciclos.

A eficiência de amplificação ( $\varepsilon$ ) de uma molécula alvo pode ser calculada ( $\varepsilon = 10^{(-1/\text{"slope"})} - 1$ ), a partir da inclinação da curva padrão ("slope" - Ct versus o  $\log_{10}$  negativo da concentração do alvo). O "slope" representa o coeficiente angular da reta composta pelos pontos da curva padrão. Uma alta eficiência de amplificação está associada a inclinação de aproximadamente 3,32 para cada diluições do alvo de 10 vezes - fator 10 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

A fim de comparar a especificidade de experimentos, é importante comparar as diferenças entre os valores de Ct do alvo definido e de alvos testes ( $\Delta$ Ct), assim como

as eficiências das amplificações do alvo definido e dos alvos testes dentro de cada experimento.

A especificidade ( $\sigma$ ) pode ser definida pela equação:  $\sigma = (1 + \varepsilon^{\Delta C_t})$ , onde  $(1 + \varepsilon)$  representa  $10^{1/\text{slope}}$  (TOO et al., 2003). Quanto maior for o valor de  $\sigma$ , mais específico é o ensaio no sentido de discriminar o alvo definido perante os alvos testes.

A sensibilidade (limite de detecção) do experimento é definida pela amplificação da maior diluição do alvo, quando comparada à formação de dímeros de iniciadores em amostras sem DNA alvo. Uma diluição em série pelo fator 10 do DNA purificado de *S. mansoni* (100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, e 10 fg) foi amplificada de forma a verificar os limites de detecção desta PCR.

Para determinar a especificidade dos ensaios de qPCR, foram analisadas seqüências de nucleotídeos codificantes para a SSU rRNA de *M. musculus*, *H. sapiens*, *B. glabrata*, e diversos parasitas bastante relacionados filogeneticamente ao *S. mansoni* e eventualmente infectivos para moluscos. Como houve acesso a uma amostragem limitada de trematodos para a realização dos experimentos, que não pertenciam ao gênero *Schistosoma*, o estudo foi complementado por uma análise teórica de seqüências SSU rRNA provenientes de parasitas adicionais.

Adicionalmente, o limite de detecção (em número de cópias) foi determinado através da análise dos amplicons correspondentes à região-alvo, os quais foram previamente purificados e quantificados, conforme descrito na seção 4.6.

#### 4.13 Análise e registro dos resultados.

Dez microlitros dos produtos de PCR, NPCR e STNPCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% com coloração pelo brometo de etídio de acordo com metodologia padronizada (SAMBROOK et al., 1989). As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta

e fotografadas com um sistema de documentação Kodak Molecular Imaging Software version 4.0.

#### 4.14 Análise estatística

A frequência positiva foi comparada utilizando o teste de McNemar (ARMITAGE, 1971). A diferença foi considerada significativa  $p < 0,05$ .

**Tabela 1** - Características dos iniciadores utilizados para detecção de *S.mansoni* em sistemas de PCR.

Primer	Seqüência	Posição de anelamento*	Tamanho do fragmento amplificado	Fita que polimeriza	Especificidade
Unvfo 2	5'-TGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'	566 – 583	800 pb	Senso	Universal
Unvre 6	5'-GGTGAGTTTCCCGTGTGAGT-3'	1344 - 1366		Reverso	Universal
Unvre 16	5'-CCGGACATCTAAGGGCATCA-3'	1620 - 1639	940 pb	Reverso	Universal
Schfo 11	5'-GTTACGATCAGGACCAGTGT-3'	699 - 718		Senso	Específico
Schfo 17	5'-GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC-3'	771 - 792	720 pb	Senso	Específico
Schre 19	5'-CTAAACGAGCACAGAGGAC-3'	1473 - 1491		Reverso	Específico
Schfo 111	5'-CGATCAGGACCAGTGTTCAGC-3'	703 – 723	120 pb	Senso	Específico
Schre 111	5'-GACAGGTCAACAAGACGAACTCG-3'	805 – 823		Reverso	Específico

Fonte: Do autor.

Notas: Tm = temperatura de fusão ("melting temperature") pb = pares de bases \* posição nucleotídica na seqüência de DNA ribossomal de *S. mansoni* (GenBank, número de acesso X53047).



A

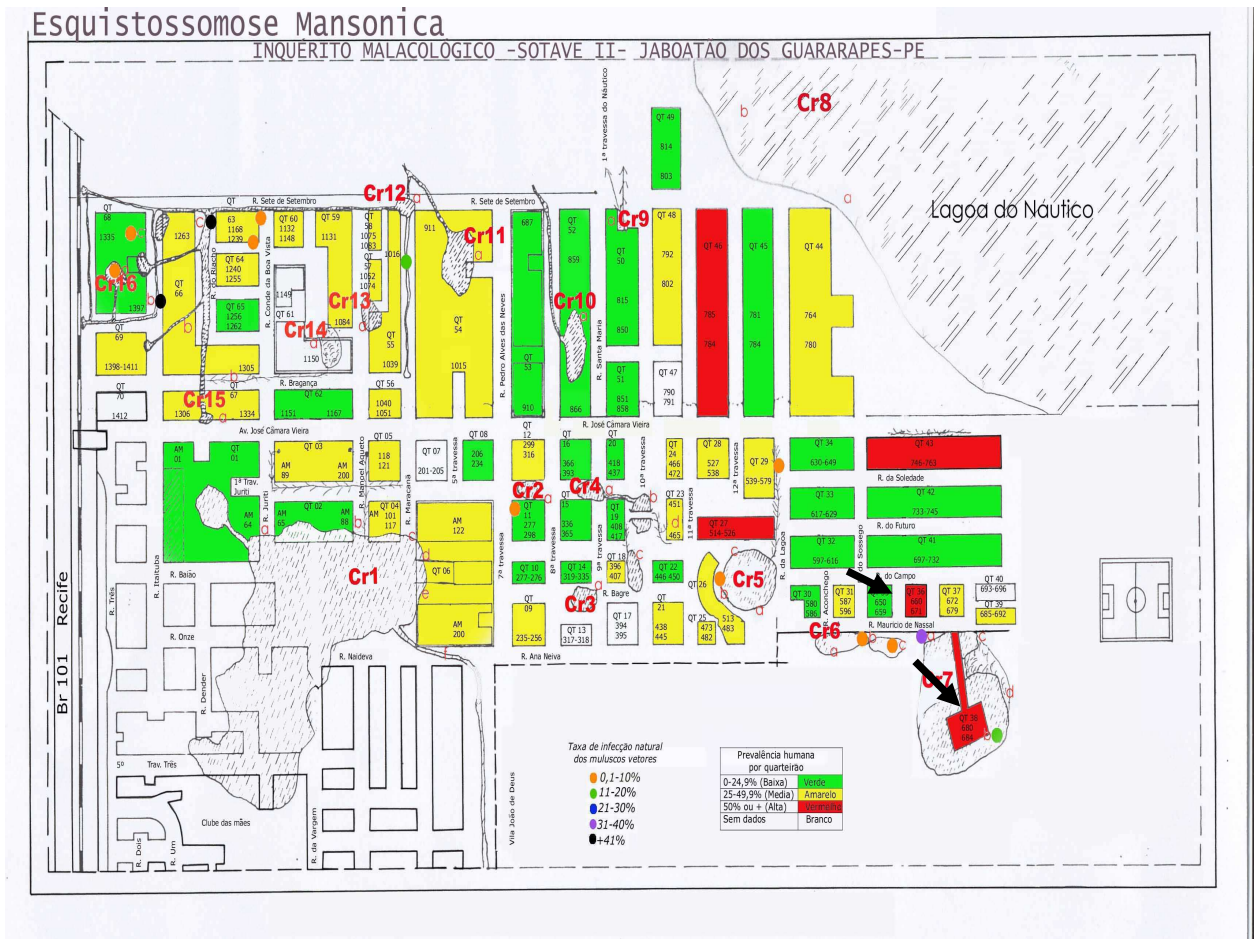


B

**Figura 5 - Região de coleta.**

Legenda: **A:** região de Novo Caiará no município de São Lourenço da Mata, PE (Brasil), uma das áreas selecionadas para coleta de moluscos.

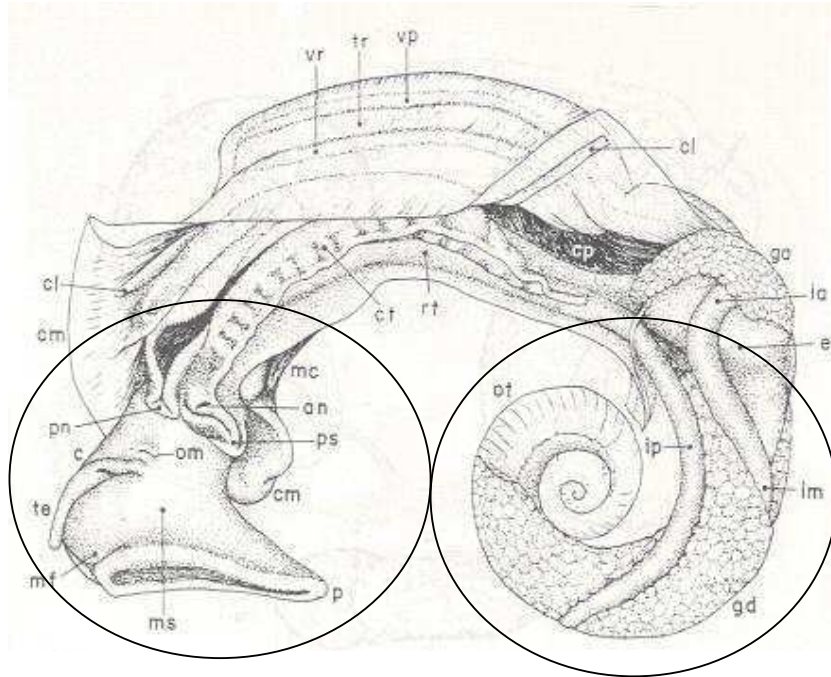
**B:** coleta de moluscos sendo realizada por técnico do Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ, Recife).



**Figura 6 - Mapa de Sotave II.**

Fonte: Barbosa (2005).

Legenda: Jaboatão dos Guararapes (PE). Inquérito epidemiológico realizado em 2005 levantou a taxa de infecção natural dos moluscos vetores e a prevalência humana. As setas indicam as regiões 6B e 7A onde foram feitas as coletas para o presente estudo.



**Figura 7 – Anatomia do *Biomphalaria*.**

Fonte: Melo (2006b).

Legenda: Parte mole de molusco do gênero *Biomphalaria*, vista do lado esquerdo, com o manto parcialmente levantado. As regiões destacadas foram excisadas (massa cefalopodal e componente visceral incluindo o hepatopâncreas e o ovoteste). Estas regiões foram utilizadas para extração de DNA an: ânus; c: cabeça; cl: crista dorsolateral; cm: colar do manto; cp: cavidade pulmonar; ct: crista retal; et: estômago; ga: glândula de albúmen; gd: glândula digestiva ou hepatopâncreas; ia: intestino anterior; im: intestino médio; ip: intestino posterior; mc: músculo columelar; mf: mufla; ms: massa cefalopodal; om: orifício genital masculino; ot: ovoteste; p: pé; pn: pneumótorax; ps: pseudobrânquia; rt: reto; te: tentáculo; tr: tubo renal; vp: veia pulmonar; vr: veia renal.

A



B



C



D

**Figura 8 – Purificação de DNA.**

Legenda: Painel apresentando 4 diferentes fases da extração e purificação de DNA em amostras de lotes de moluscos.

**A** - os moluscos pós coleta;

**B** - homogenato após solução de lise e centrifugação;

**C** - homogenato na fase de purificação com clorofórmio, e

**D** – “pellet” final, após precipitação com isopropanol.

A



B



C



D

**Figura 9 – Diagnóstico da infecção de molusco.**

Legenda: A, B e C mostram os moluscos individualmente em compartimentos contendo água de clorificada e expostos à luz artificial. D análise microscópica da presença ou ausência de cercarias na água.





Iniciadores internos corados e fixados no interior da tampa do tubo.

**Figura 10 - Iniciadores internos imobilizados na superfície interna da tampa do microtubo.**

Fonte: Melo (2006b).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Desenvolvimento de iniciadores para sistema de PCR em tempo real.

Foi selecionada uma região na porção 18S rRNA no genoma de *S. mansoni* de modo que os iniciadores amplificassem apenas o fragmento específico no DNA do parasito e não de outros organismos envolvidos no seu ciclo biológico ou evolutivamente próximos.

Assim, usando o programa ClustaW de alinhamento múltiplo de seqüências de nucleotídeos foram alinhadas as seqüências de nucleotídeos de *S. mansoni*, *Biomphalaria*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e alguns dos trematódeos relacionados ao *S. mansoni*. Selecionamos uma região que apresentou muitas divergências entre as espécies envolvidas na análise, o que possibilitou a seleção de uma seqüência-alvo (Figura 11) para amplificação específica do DNA de *S. mansoni*. Dessa forma, desenhamos então os iniciadores Schfo111 e Schre111, específicos para a seqüência selecionada.

### 5.2 Clonagem e seqüenciamento de amplicon.

Para a otimização e validação dos sistemas de detecção molecular é necessário a utilização de padrões de qualidade e quantificação confiáveis.

Com essa finalidade, foi amplificada e clonada a seqüência-alvo (940 pb) e a autenticidade dos produtos de amplificação clonados foi confirmada por seqüenciamento. O alinhamento múltiplo utilizando o programa BLASTn mostrou que os produtos dos seqüenciamento tinham 98% e 96% de similaridade (quando gerado pelos iniciadores Schfo 11 e Unvre 16, respectivamente) com a seqüência *X53047.1/SMSSSRNA/ Schistosoma mansoni small subunit rRNA gene* do banco de dados do NCBI.

### 5.3 Determinação da eficiência, especificidade e sensibilidade da PCR em tempo real.

Por se tratar de um estudo pioneiro é fundamental que informações sobre a eficiência, especificidade e sensibilidade das reações de PCR em tempo real sejam apresentadas a fim de garantir que as condições de amplificação estejam ideais.

A Figura 12A mostra as curvas de amplificação obtidas para quantidades conhecidas e decrescentes de DNA genômico de *S. mansoni*, resultando em um limite de detecção entre 10 e 100 fg de alvo. A curva de dissociação (Figura 12B) mostra a amplificação de fragmentos de um mesmo tamanho devido a presença de um único pico observado a 83°C correspondente à  $T_m$  do produto de amplificação. A eficiência de amplificação foi 0,99 ( $10^{(-1/-3,32)} - 1$ ), e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi 0,97 (Figura 12C), o que representa um grau de associação entre as variáveis (Ct e log da quantidade).

Quando diferentes números de cópias de alvo foram usados como padrões (1000, 100 e 10 cópias do alvo), o experimento permitiu a detecção de no mínimo 10 cópias do alvo específico (Figura 13).

Como pode ser observado na Figura 14, a qPCR composta pelos iniciadores Schfo111 e Schre111 amplificou apenas o DNA de *S. mansoni*, e não dos outros trematódeos, exceto *S. bovis*. Os resultados mostram que o ensaio é cerca de 4000 vezes ( $\sigma = (1 + \epsilon^{\Delta Ct})$ ) mais específico para o *S. mansoni* em relação ao *S. bovis*. A discriminação dos *amplicons* foi feita analisando a curva de dissociação através dos diferentes valores de  $T_m$  (MANGOLD et al., 2005).

### 5.4 Determinação da especificidade dos sistemas de detecção molecular (PCR, NPCR, STNPCR).

O estudo da especificidade de cada sistema de PCR é importante, pois garantirá que só será amplificado o DNA específico, minimizando os riscos de resultados falso-positivos devido às amplificações cruzadas.



Quando utilizamos o sistema de PCR baseado nos iniciadores Schfo11 e Unvre16 verificamos que apenas o DNA de *S. mansoni* foi amplificado (Figura 15A) destacando-se assim a grande especificidade desse par de iniciadores. O par de iniciadores Schfo17 e Schre19 amplificou, além do DNA de *S. mansoni*, DNAs de *S. bovis* e *S. haematobium* (Figura 15A). Como controle positivo das reações, utilizamos os iniciadores universais, Unvfo2 e Unvre6 e observamos que o DNA alvo de todas as espécies testadas foram amplificados (Figura 15A). O uso do par Schfo11 e Unvre16 como iniciadores externos e Schfo17 e Schre19 com par interno nas reações de NPCR e STNPCR, resultou na amplificação de *S. mansoni* e também de *S. haematobium* (Figura 15B).

### 5.5 Extração e purificação de DNA em lotes de moluscos

A extração e purificação de DNA foi realizada em lotes de moluscos com fenol-clorofórmio seguido de nova purificação com o método baseado em matriz caotrópica de sílica. Não houve diferença no limite de detecção dos sistemas de PCR entre as duas técnicas (fenol-clorofórmio seguido de sílica e apenas utilizando fenol-clorofórmio) de modo que os produtos tiveram qualidades equivalentes sendo adequada para a detecção molecular. Sendo dessa forma selecionado o uso de fenol-clorofórmio.

Diluições de fator 10 de DNA genômico de *S. mansoni*, variando entre 400 ng a 0,4 pg, foram acrescentados antes da purificação aos lotes compostos por 50 moluscos *B. glabrata* provenientes do Laboratório de Esquistossomose. Para as PCRs, 0,2% das amostras purificadas foram analisadas. A PCR foi capaz de detectar 40 ng de DNA alvo (80 pg/reação), as modalidades de NPCR e qPCR detectaram 0,4 ng (0,8 pg/reação) e a STNPCR detectou 4 ng de DNA alvo (8 pg/reação) (Figura 16).

## 5.6 Identificação de focos de transmissão da esquistossomose através da detecção do DNA de *S. mansoni* em lotes de moluscos vetores, *B. glabrata* e *B. straminea*.

Foram testados dois métodos (padrão-ouro e abordagens moleculares) para identificação de focos de transmissão da esquistossomose, a fim de validar a detecção molecular em amostras de lotes de moluscos e também comparar os resultados entre os dois métodos.

A Tabela 2 detalha os resultados da identificação de focos de transmissão da esquistossomose a partir da detecção do DNA de *S. mansoni* em lotes de moluscos vetores coletados no campo (*B. glabrata* e *B. straminea*) e analisados através da exposição à luz e PCR, NPCR, STNPCR e qPCR. A detecção por qPCR de todos os lotes é exclusiva e pioneira nessa dissertação, onde houve também aumento do número de lotes coletados, principalmente lotes de *B. straminea*.

Através da Tabela 2 identificamos que 37,5% dos lotes de moluscos foram positivos quando analisados pela exposição à luz (padrão-ouro). A análise por PCR foi positiva em 37,5%, por NPCR em 93,75%, por STNPCR em 81,25% e por qPCR em 87,5%. Quando comparados os dois métodos, padrão-ouro e abordagens moleculares, os resultados confirmaram que a NPCR, STNPCR e a qPCR são significativamente ( $p < 0.05$ ) mais sensíveis do que a PCR e que a técnica padrão-ouro.

As amostras negativas para detecção molecular foram analisadas em PCR com iniciadores universais (Unvfo2 e Unvre6) e todas amplificaram a seqüência com 800 pares de bases, exatamente o tamanho do fragmento gerado com esses iniciadores (Figura 17).

## Schfo 111 5' CGATC-AGGACCAGTGTTCAGC 3'

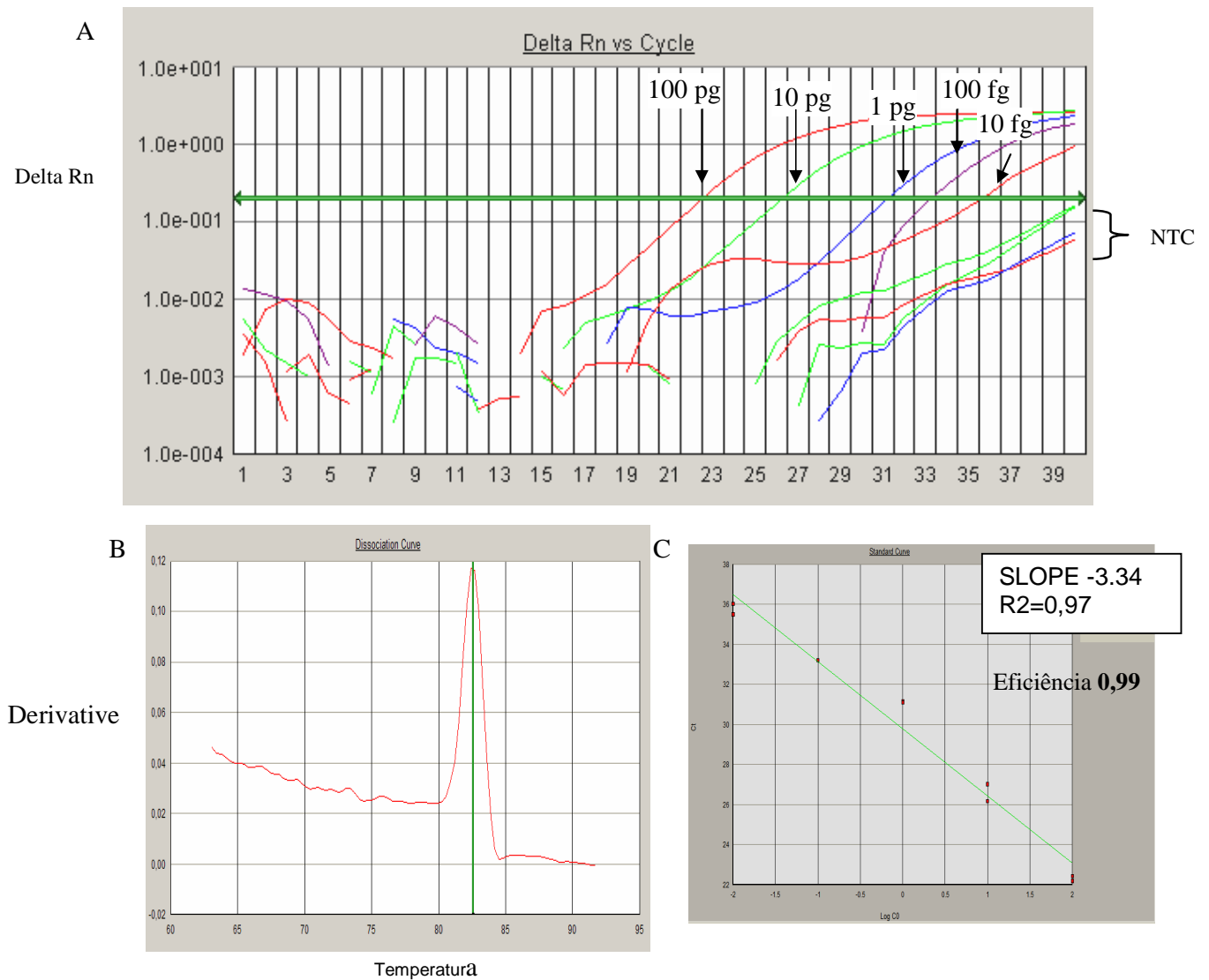
S.mansoni	A <b>CGATCAGGACCAGTGTTCAGC</b> TCGGTGTAGTGGCTGTGCAGCCTT--TC	749
Trichobilharzia	ACGATCAGAACTTGTGTTTCGGCTCGGTGTAGTGGTGTGCAGCCTT--TC	731
Clinostomum	A--AACCGGGCTGATGTTCAAGTTGGTGTAGTGGCGTGCCTT--TC	737
Diplostomum	AGTTTCAGG-----CGA--TGGTAAAGTGGTCGTGCAGCCTT--TC	729
Calicophoron	ACGACCGGATTGAGTTCATGAGTCGGTGTAGTGGTGTGCAGCCTT--TC	752
Maritrema	TCGGTCCG-TCCGGTTTGTGAGTCGGTTTTCTGGCTGTGTAGCCTT--TC	730
S.bovis	-----	
S.haematobium	GGGTTTAATCTTGTTTTTTC-CCTATGCATTATTTAGGTATTCATGGTT	7626
S.japonicum	GGTTTAAATTTGTGTTTTTTT-CCGATGCATTATTTAGGTGTTCATGGGT	10325
B.glabrata	TAGAACAAA-TAAATATAATTAATATTTATT-TTTAATAAGTCTTAGTT	9794
Echinostoma	-----	
Homo sapiens	ATAGAGGATCTTGGTGTGCACTTCCTCCTATATGTTTTAAAAGAAATTACA	5822

## Schre 111 5' GACAGGTCAACAAGACGAACTCG 3'

S.mansoni	AGCCGTGTCTGTGTT-AAACGGGTGCTGGTGGG--TTGA-- <b>CGAGTTCGT</b>	794
Trichobilharzia	AGCCGTATCTGTGT--AAACGGGTGCTGACGGAGATGGG--TGAGTTTAT	777
Clinostomum	AGCCGTGTCTGTGC--AAACGGGTGCTGACTGGG--TTGA--TGAGCTTGT	782
Diplostomum	AGCCGTGTCTGCGT--AAGCAGGTGTTGGCTGG--CTGG--TGAGCTTGC	773
Calicophoron	TGCCGTGTCTGTTT--T-ACAGGTGCTGGTGG--TTGT--TGGGTTCCG	795
Maritrema	AGTCGTGTCTGTTT--CGACAGGTGCCGATGG-----	760
S.bovis	-----	
S.haematobium	TGCCTCGTCGGGTTA-GTAGCTATGATTTTGAATATTAT--TGAATTAAA	7673
S.japonicum	TGCCACGTCGTGTTA-GATGTTATGATCCTGAGTTTAT--TTGGTTAAA	10372
B.glabrata	TAAACTTGGAAATTTTCCAGGGCATTTTTGAGTTCCAAGATTAGTTAAT	9844
Echinostoma	-----	
Homo sapiens	GACTACTCTTGTCCGTGGATACCAGGTCCAATG-----GCTGAC	5861
S.mansoni	<b>CTTGTGACCTG</b> CTGTCCGCATGCTTCCGGATGCCTTTAAACGGGTGTC	840
Trichobilharzia	TCTTGCCCGCTATCTGTTGGCATGCTTCCGGATGCCTTTAAACGGGTGTC	827
Clinostomum	-CTTGTTAAC---CTGTTGGCATGCTTCTAGATGCCCTTTACCGGGTGTG	828
Diplostomum	--TTGCTGGT---CAGTTGACATGTTTCTGATGCCTTTAAACGGGTGTC	818
Calicophoron	--CCTTCAGT---CTGTCCGCATGCTTCCGAATGCCTTTAAACGGGTGTT	840
Maritrema	----TTCA-T---CCGTTGGCATGCTTCCAGATGCCTTTAAACGGGTGTC	802
S.bovis	-----	
S.haematobium	GTGTTAAGGAGTATAGGTGGAGTGTATCTGTTACTAGTGCTTTTGTGTT	7723
S.japonicum	GTTTTTAGGAGTATAGGTGGTGTGTATCTGTAAC TAGTTCGATGGTTTT	10422
B.glabrata	TCTTTAAGATGGGTTAGAAAATAAATACTTTTAGGACCTTTGAAAATTGC	9894
Echinostoma	-----	
Homo sapiens	TTTCAACGTTTACATGCTGTGCAAGGCCCTCACCAATAAGCTGCAGGTGCG	5911

**Figura 11 - Alinhamento múltiplo usando ClustalW de segmentos do gene que codifica o rRNA 18S de várias espécies.**

Legenda: As seqüências em destaque correspondem à localização dos iniciadores desenhados. Número de acesso das seqüências: S. mansoni X53047.1, Trichobilharzia AF420479.1, Clinostomum AY245760.1, Diplostomum AY245761.1, Calicophoron L06566.1, Maritrema AJ287534.1, S. bovis L03653.1, S. haematobium NC\_008074.1, S. japonicum AF215860.1, B. glabrata NC\_005439.1, Homo sapiens NM\_014503.2.



**Figura 12 - Painele apresentando informações sobre a qPCR.**

Legenda: **A** - padrões acima do "threshold" correspondem a 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, e 10 fg de DNA de *S. mansoni*, NTC (controles negativos sem DNA alvo) esses últimos estão abaixo do "threshold";

**B** - curva de dissociação exibindo um perfil representativo para o amplicon alvo.

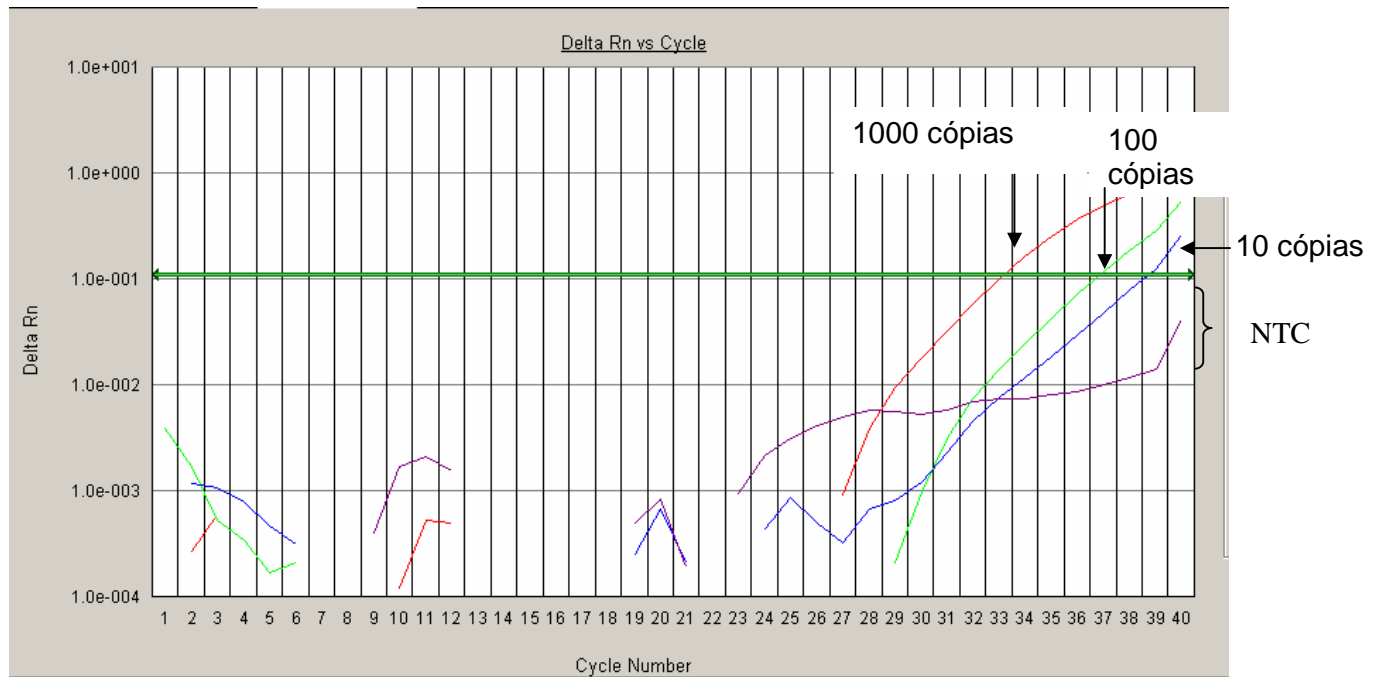
**C** - demonstra a curva padrão a partir da qual é calculada a eficiência da reação.

Delta Rn – diferença entre o sinal de fluorescência inicial (Rn0) e final (Rn1)

"Derivative" – derivada da fluorescência

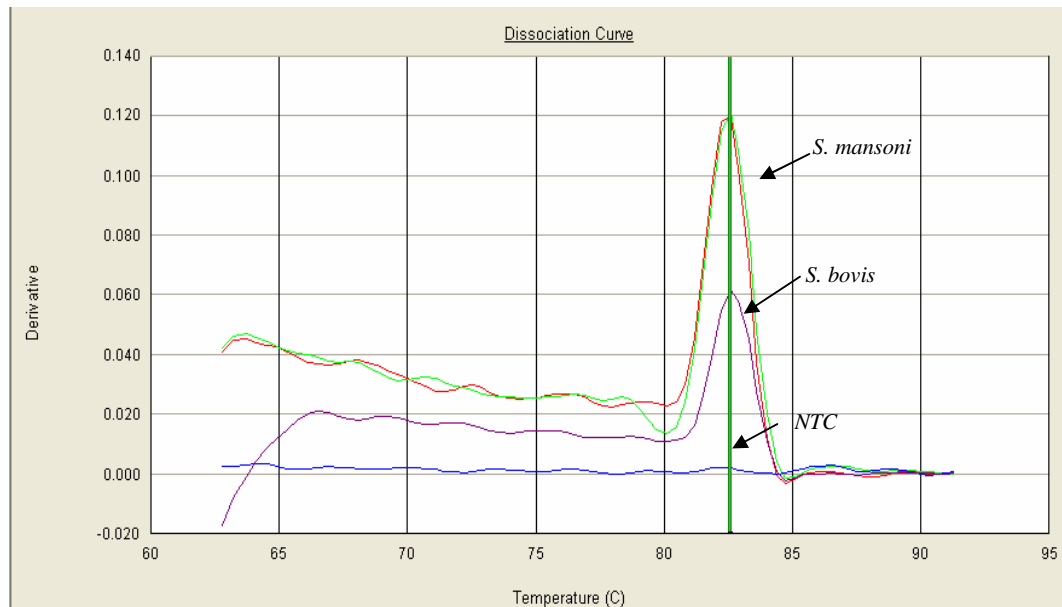
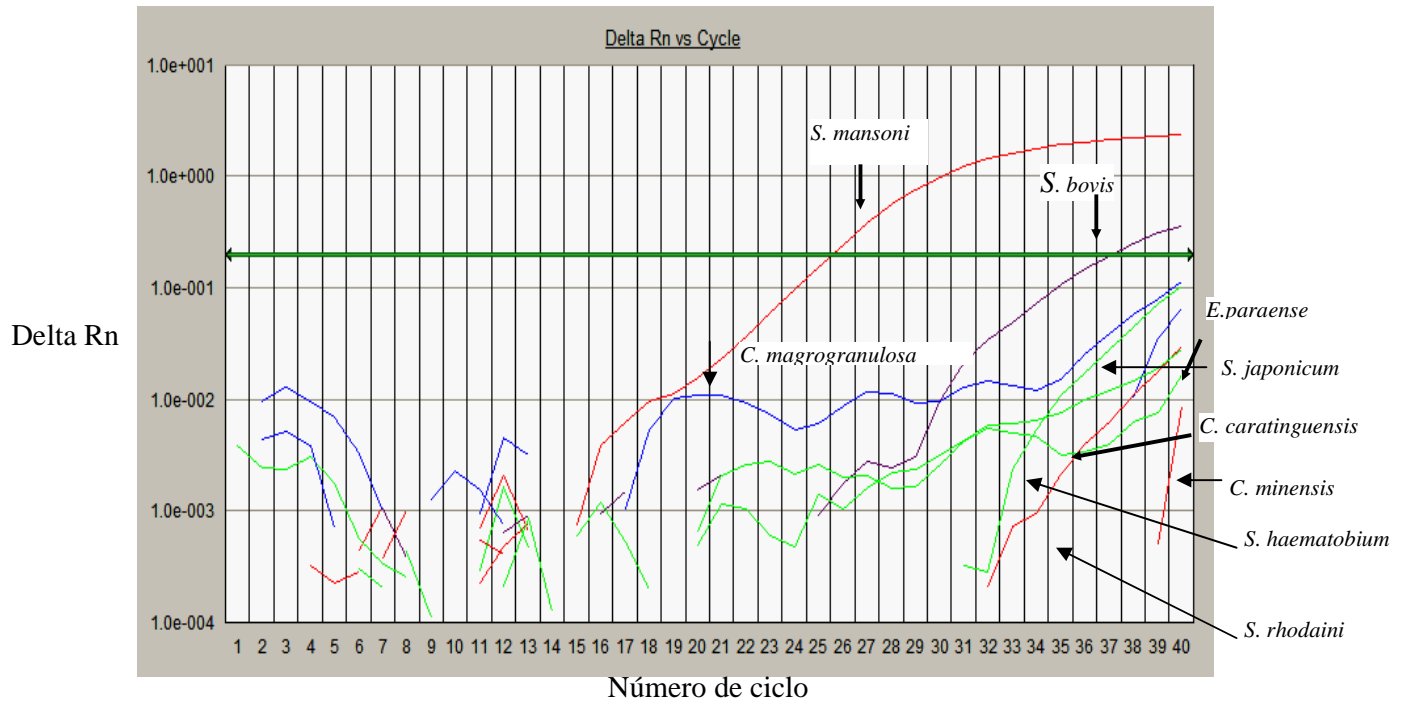
Ct – cycler treshold

LogCO – logaritmo da concentração



**Figura 13 - Limite de detção da qPCR.**

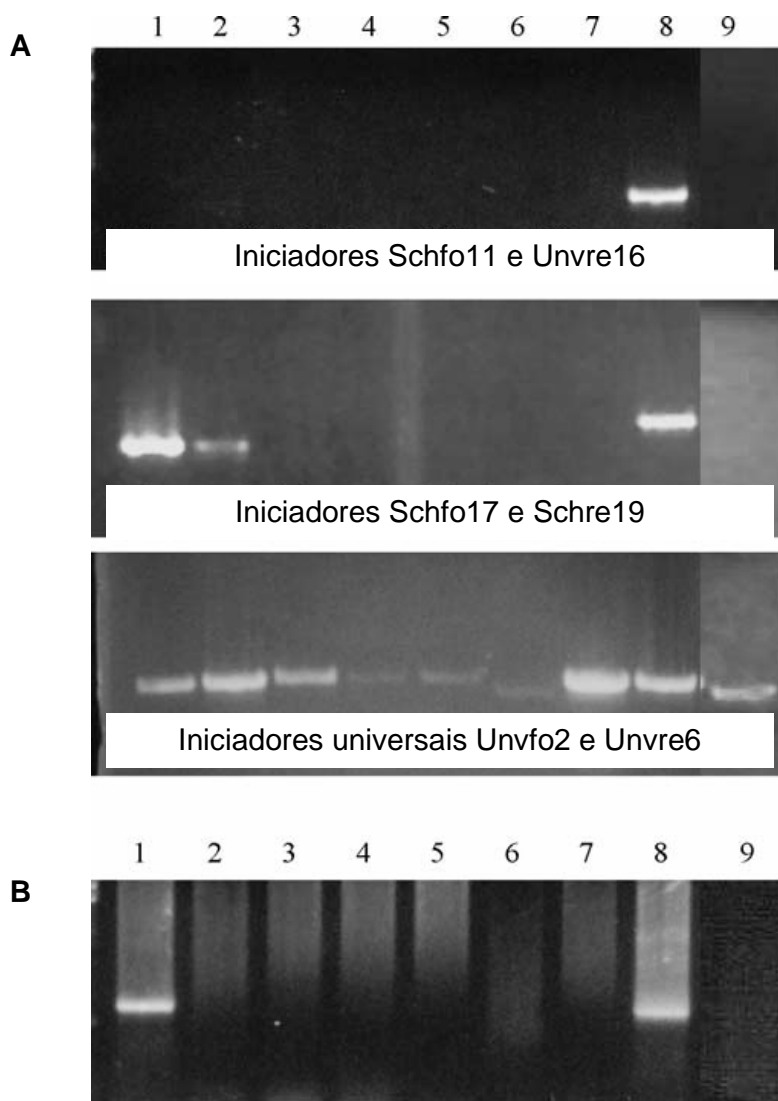
Legenda: Apresenta os padrões acima do "threshold" correspondem a 1000 cópias, 100 cópias, 10 cópias do alvo, NTC (controles negativos sem DNA alvo) os últimos estão abaixo do "threshold".



**Figura 14 - Especificidade da qPCR.**

Legenda: **A** - quantidade definida (100 pg) de DNA de *S. mansoni*, *S. bovis*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. rhodaini*, *Echinostoma paraense*, *Cercaria minensis*, *C. macrogranulosa*, and *C. caratinguensis* foi testada por PCR em tempo real. As setas indicam as curvas correspondentes a cada um dos trematodos.

**B** - curva de dissociação mostrando os picos referentes ao *S. mansoni*, *S. bovis* e NTC com  $T_M \sim 83^\circ\text{C}$ .

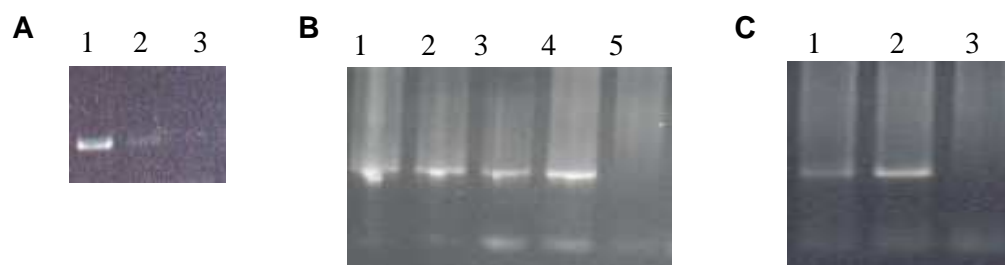


**Figura 15 - Painel apresentando a especificidade dos sistemas de PCR.**

Legenda: Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando a especificidade de amplificação (100 pg de DNA foi utilizado). **A** - PCR (iniciadores indicados na figura); **B** - NPCR e STNPCR.

As colunas indicam:

- S. haematobium* (1);
- S. bovis* (2);
- S. japonicum* (3);
- Cercaria minensis* (4);
- C. macrogranulosa* (5);
- C. caratinguensis* (6);
- Echinostoma paraensis* (7);
- S. mansoni* (8), e
- B. glabrata* (9).



**Figura 16 - Pannel mostrando limite de detecção de DNA gênomico de *S. mansoni* das PCR, NPCR e STNPCR quando testados os lotes de moluscos.**

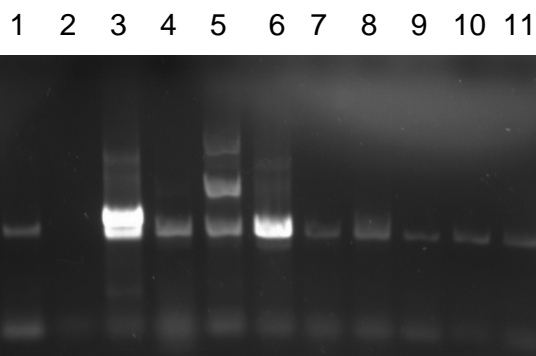
Legenda:

**A** - PCR ; 800 pg (1), 80 pg (2) e 8 (3) pg.

**B** - NPCR; 800 pg (1), 80 pg (2), 8 pg (3), 0,8 pg (4), 80 fg (5).

**C** - STNPCR 80 pg (1), 8 pg (2) e 0,8 pg (3).





**Figura 17 - Lotes de moluscos vetores analisados por PCR com iniciadores universais, Unvfo2 e Unvre6.**

Legenda: As colunas indicam:

1 pg DNA gênomico de *S. mansoni* (1);

NTC (2);

Ponta de Pedra A (3);

Ponta de Pedra B (4);

Ponta de Pedra C (5);

Riacho (6);

RA (7);

RB(8);

NC16-A (9);

NC16-B (10), e

Qt14 (11).

**Tabela 2** – Características de lotes de moluscos e resultados do método diagnóstico convencional baseado na eliminação de cercarias, juntamente com os resultados através de PCR, Nested PCR (NPCR), single tube nested PCR (STNPCR) e PCR quantitativa em tempo real quantitativa (qPCR).

(continua)

Lote	Prevalência de infecção humana	Número de moluscos	% Moluscos eliminando cercarias	PCR	NPCR	STNPCR	qPCR (pg de DNA genômico)***	qPCR (número de cópias de alvo)****	Número de células de <i>S. mansoni</i>
PA	Desconhecida	25	22	+	+	+	247	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>
16A	Leve	9	1,1	-	-	+	83	10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>
16C	Leve	20	10	-	+	+	34,5	10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>
9A	Leve	19	5	-	+	+	0,14	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
4B	Moderada	20	0	+	+	+	1,3	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>
5B	Moderada	26	0	+	+	+	0,14	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
6B	Moderada	15	0	+	+	+	0,57	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
6C	Moderada	3	0	-	+	+	0,58	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
7A	Alta	25	0	-	+	+	0,25	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
C2	Leve	38	39	+	+	+	102	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>
Qt29	Leve	26	0	-	+	+	0,29	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
C3-2	Leve	37	0	-	+	+	0,18	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
16B	Alta	47	55	+	+	+	140	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>
Qt19*	Moderada	50	0	-	+	-	-	-	-

Lote	Prevalência de infecção humana	Número de moluscos	% Moluscos eliminando cercarias	PCR	NPCR	STNPCR	qPCR (pg de DNA genômico)***	qPCR (número de cópias de alvo)****	Número de células de <i>S. mansoni</i>
R1A*	Moderada	50	0	-	+	-	-	-	-
R1B*	Moderada	50	0	-	+	-	0,9	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup> -
Frequência de positividade**			6/16 (37,05%)	6/16 (37,5%)	15/16 (93,8%)	13/16 (81,25%)	14/16 (87,5%)	14/16 (87,5%)	-
Riacho*- moderado <sup>o</sup>		4	0	-	-	-	-	-	-
RA* - moderado <sup>o</sup>		18	0	-	-	-	-	-	-
RB* - moderado <sup>o</sup>		36	0	-	-	-	-	-	-
NC16-A* - moderado <sup>o</sup>		80	0	-	-	-	-	-	-
NC16-B* - moderado <sup>o</sup>		80	0	-	-	-	-	-	-
Qt14* <sup>o</sup> - moderado <sup>o</sup>		103	0	-	-	-	-	-	-
Ponta de Pedra A** <sup>+</sup>		60	0	-	-	-	-	-	-
Ponta de Pedra B** <sup>+</sup>		60	0	-	-	-	-	-	-
Ponta de Pedra C** <sup>+</sup>		60	0	-	-	-	-	-	-

Outros trematódeos foram observados apenas nos lotes 4B e PA.

As prevalências de infecção humana foram categorizadas como leve (<25%), moderada (25-44, 9%) e alta (>50%).

\* Indica *B. straminea*, enquanto que os outros lotes são compostos de *B. glabrata*.

\*\* A diferença nas frequências de positividade foi significativa ( $P < 0,05$ )

\*\*\* A quantificação foi realizada utilizando, como padrão, DNA genômico de *S. mansoni*.

\*\*\*\* A quantificação foi realizada utilizando, como padrão, cópias do amplicon alvo específico da PCR.

<sup>o</sup> Inquérito epidemiológico em andamento, informação preliminar através de comunicação pessoal (*The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases –TDR*, coordenador dr Otávio Pieri).

<sup>+</sup> Região sem informação sobre prevalência humana.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciam que os métodos moleculares são uma alternativa viável para o diagnóstico de infecções de *S. mansoni*, através da detecção do DNA do parasito, em lotes de moluscos vetores.

Existem, na literatura, algumas publicações que propõem a utilização da PCR e suas variações para o diagnóstico molecular da esquistossomose. Porém, uma das maiores dificuldades em se desenvolver estudos moleculares utilizando amostras biológicas está no fato de que o sucesso da PCR é limitado, parcialmente, pela presença de substâncias inibidoras nas amostras, que podem reduzir ou mesmo impedir que ocorra a amplificação do alvo (RADSTRÖM et al., 2004). Destaca-se aqui a importância da fase pré-PCR (METZKER et al., 2003).

Foram testadas duas técnicas clássicas de extração de DNA (fenol-clorofórmio e matriz de sílica) sendo selecionado o fenol-clorofórmio por apresentar importantes vantagens para o propósito final desse trabalho que é oferecer uma alternativa para o diagnóstico da esquistossomose em moluscos vetores. Dentre as vantagens, salientamos, a capacidade ser uma técnica operacionalmente simples, estar otimizada para ser realizada em 3 horas e com reagentes de baixo custo (em substituição aos kits pré-fabricados), minimizando os gastos com reagentes e recursos humanos especializados. Essas características são fundamentais para o propósito maior desse trabalho que consiste em viabilizar o uso da PCR e suas variações para o diagnóstico da esquistossomose em larga escala

Nesse estudo os moluscos foram analisados em lotes, diferentemente do observado em Hamburger (2004) que propôs monitoramento em larga escala da infecção de *S. haematobium* em moluscos, porém, analisando-os individualmente. A análise em lotes diminui o tempo e custos necessários para o diagnóstico, aumenta a amostragem analisada e ressalta a otimização dos protocolos de purificação de DNA para torná-los viáveis e eficientes.

As abordagens moleculares baseadas em PCR desenvolvidas e utilizadas foram altamente específicas, principalmente quando utilizados o par de iniciadores Schfo11 e Unvre16, sugerindo que o iniciador Schfo11 está localizado em uma região de grande especificidade do genoma do *S. mansoni*. Essa informação tem

relevância, pois o iniciador Schfo111 (qPCR) foi desenhado na mesma seqüência deslocando 6 nucleotídeos para a direita no genoma do parasito.

A qPCR foi capaz de amplificar especificamente o DNA de *S. mansoni*. Apesar da qPCR ter sido capaz de amplificar especificamente o DNA de *S. mansoni*, devemos ressaltar que o DNA do *S. bovis* foi, também, amplificado. No entanto é importante observar que a amplificação gerou Ct no valor de 38 o que segundo Too et al. (2003) valores de Ct maiores que 35 utilizando SYBR Green I sugerem resultados falso positivos. Além disso, a análise da curva de dissociação diferencia as duas amostras devido as amplitudes distintas dos picos da Tm.

Ainda relacionado as amplificações, no estudo de Melo et al. (2006a) foi demonstrado que esses sistemas não amplificam o DNA dos hospedeiros definitivo e intermediário do *S. mansoni*.

As abordagens moleculares (PCR, NPCR, STNPCR e qPCR) com modelo de *S. mansoni* utilizadas nesse estudo são extremamente eficientes e sensíveis (MELO et al., 2006a; MELO, 2006b). Dentre elas, o sistema de qPCR foi desenvolvido e otimizado para a detecção de 10 fg de DNA genômico e pelo menos 10 cópias de alvo, o que corresponde ao DNA de menos de uma célula do parasito uma vez que seu genoma contém 580 fg de DNA (LO VERDE et al., 2004). Além disso, a região alvo selecionada para amplificação está presente aproximadamente 100 vezes no genoma do *S. mansoni* (JOHNSTON et al., 1993).

Por outro lado, quando foi comparado os valores de sensibilidade de detecção em amostras com DNA purificado e lotes de moluscos foi observada perda da sensibilidade em amostras nos lotes. Esse fato, não inviabiliza seu uso, uma vez que a PCR, menos sensível que a qPCR, NPCR e STNPCR, tem um limite de detecção bastante satisfatório, considerando que 10 miracídios correspondem a 0,45 ng de DNA (MELO et al., 2006a). A discrepância observada entre a sensibilidade da detecção do DNA purificado do parasito e em lotes pode ser justificada pelas perdas que ocorrem durante o procedimento de purificação e também devido a presença de inibidores de PCR nas preparações de lotes de moluscos.

Os resultados mostraram que alguns lotes negativos para a técnica de exposição a luz, foram positivos na detecção molecular, principalmente NPCR e STNPCR. Isso é importante, pois sinaliza a capacidade da detecção molecular em diagnosticar infecções pré-patentes em moluscos, o que não é possível pela técnica de exposição à luz (MELO et al., 2006a). Outra importante observação é que os

lotes negativos analisados através da exposição a luz que tiveram seu DNA alvo detectado foram aqueles com baixas quantidades de DNA ( $\leq 1$  pg), apresentando uma possível relação entre os dois métodos de diagnóstico, corroborando a idéia de que é possível detectar DNA do *S. mansoni* em moluscos antes mesmo da liberação de cercárias.

Em relação a qPCR, os valores detectados também apresentam relação com o resultado da exposição a luz. Os lotes de moluscos diagnosticados positivamente pela técnica de exposição a luz foram aqueles onde o DNA alvo estava presente em maior número de cópias. Já os lotes analisados que tiveram menor quantidade de moluscos liberando cercárias ou mesmo alguns negativos, tinham a menor quantidade de DNA alvo nas amostras. Isso justifica a importância da utilização da abordagem molecular quantitativa principalmente para o estudo que pretendemos realizar sobre a estimativa do grau de infectividade dos lotes de moluscos e consequentemente dos focos analisados.

Nove lotes de *B. straminea* analisados posteriormente Melo et al. (2006a) foram negativos tanto para a técnica de exposição a luz como também para as abordagens moleculares e isso está de acordo com Barbosa et al. (1992) que relata que a *B. straminea* tem menor capacidade de eliminar cercárias. Por outro lado, a maioria dos lotes de *B. straminea* foi coletada em região de prevalência humana moderada, não sendo encontrados moluscos positivos mesmo dentre os coletados em valas peridomiciliares com comprovada contaminação fecal.

Todas as amostras negativas foram submetidas a PCR com iniciadores universais para evitar resultados falso-negativos (RADSTRÖM et al., 2004), confirmando que o DNA testado estava em condições de amplificação, sendo, portanto, negativas para o DNA do parasito. Foi realizada uma tentativa para que o par de iniciadores universais fizesse parte das abordagens moleculares como controle interno, no entanto, comprovamos haver competição entre os iniciadores o que acarretava diminuição na sensibilidade dos ensaios.

Estudos futuros serão feitos sobre a infectividade dos lotes analisados, para que dessa forma possa ser estimado o risco de infecção dos focos de transmissão. Estudos preliminares realizados por nós sobre o diagnóstico da esquistossomose com o uso de qPCR em amostras de soro e fezes humanas mostram que é possível, de forma rápida e simples, o diagnóstico em amostras biológicas humanas relacionando a infectividade com a carga parasitária. No entanto, o número de

amostras testadas é ainda muito pequeno, devendo ser aumentado para observação da permanência dessa relação, e conseqüente validação dos resultados.

O Laboratório de Esquistossomose do CPqAM/FIOCRUZ-PE está em fase de treinamento e estruturação para utilizar as ferramentas moleculares como alternativa no diagnóstico dos focos de transmissão da doença. Atualmente o trabalho é realizado em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pertencente ao Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE, onde são feitas as reações de PCR, e a fase de extração e purificação do DNA.

O que motivou a realização desse trabalho foi a possibilidade de oferecer uma alternativa para a identificação de focos de transmissão da esquistossomose. Dessa forma, esperamos que os resultados desse trabalho demonstrem que as ferramentas moleculares são possíveis alternativas para monitorar focos de transmissão da doença e diagnóstico quantitativo de *S. mansoni*.

## 7 CONCLUSÃO

- A identificação de focos de transmissão da esquistossomose através da detecção do DNA do *S. mansoni* é possível com a utilização de ferramentas moleculares baseadas em PCR como: NPCR, STNPCR e qPCR. As ferramentas moleculares podem ser consideradas uma alternativa à técnica convencional para identificar focos de transmissão da esquistossomose.
- A capacidade de detecção das ferramentas moleculares é superior à técnica padrão-ouro utilizada para identificar moluscos vetores infectados com *S. mansoni*.
- As abordagens moleculares podem ser utilizadas em larga escala, a partir de amostras em lotes de até 100 moluscos vetores (*B. glabrata* e *B. straminea*).
- Existe relação entre o diagnóstico de moluscos vetores através da exposição à luz e a quantificação por qPCR, onde os lotes com maior número de cercárias liberadas tem também maior número de cópias de alvo detectado molecularmente. Outro importante aspecto é que os lotes com menor quantidade de DNA detectado foram negativos no padrão-ouro, destacando a capacidade de detectar infecções pré-patentes.



## REFERÊNCIAS

ABATH, F. G. C.; WERKHAUSER, R. P.; MELO, F. L. Método, kit e iniciadores para a identificação de seqüências de nucleotídeos através da reação em cadeia de polimerase tipo Nested em único tubo de reação. Depósito de pedido de patente Br-PI 0204901-5 junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Nov. 2001.

ABATH, F. G. C. et al. Single Tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, Dec. 2002.

ABATH, F. G. C. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snails infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1001, supl. 1, p. 145-148, nov. 2006a.

ABATH, F. G. C.; GOMES, A. L. V.; WERKHAUSER, R. P. Método, kit e iniciadores para identificação quantitativa se seqüências de nucleotídeos de *Schistosoma mansoni* através de PCR em tempo real. Depósito de pedido de patente Br-PI 0604953-2 junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Dez. 2006b.

ALBERTS, B. et al. Tecnologia do DNA recombinante. In: \_\_\_\_\_. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 7, p. 291-334.

APPLEID BIOSYSTEMS. **Real Time Guide**. Atlanta, 2005. Disponível em:<<http://www.appleidbiosystems.com/realtiméguide>>. Acesso em: 15 jun. 2005.

ARMITAGE, P. **Statistical Methods in Medical Research**. Oxford: Black-well Scientific Publications, 1971.

BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B. Epidemiologia da Esquistossomose Mansônica no Engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 83-87, abr. 1992.

BARBOSA, C. S. Methods for malacological work in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 311-312, set. 1992.

BARBOSA, C. S. et al. Specif Situations Related to Acute Schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 169-172. mar. 2001.

BARBOSA, C. S. **Mapa de Sotave II. Recife, 2005. 1 fotografia.**

BARRETO, M. L.; SMITH, D. H.; SLEIGH, A. C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 84, n. 4, p. 554-555, July/Aug. 1990.

CALDEIRA, R. L. et al. Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 499-502, nov. 2004

COLMENARES, C. et al. Reactividad cruzada em el inmunodiagnóstico de la esquistosomiasis mansoni. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v. 44 p. 211, Jun. 1993.

DESLANDES, N. Técnicas de dissecação e exame de planorbídeos. **Revista da Secretaria do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 4, p. 371-382. fev. 1951.

DIAS, L. C. S. et al. Epidemiology of schistosomiasis mansoni in a low endemic area. **Caderno de Saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 10 supl 2, p. 34-39, jul. 1994.

EBRAHIM, A. et al. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, p. 706-708, Set./Out. 1997.

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. 1990.

ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSEESL, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 54, n. 4, p. 319-324, Apr.1996.

FAVRE, T. C. et al. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 565-567, set. 1995.

- FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 569-576, abr. 2001.
- FAVRE, C. T. et al. A longitudinal study on the natural infection of *Biomphalaria straminea* and *B. glabrata* by *Schistosoma mansoni* in a endemic area of schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 465-475, jun. 2002.
- FLEKNA G. et al. Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, May 2007. *In press*.
- GOMES, A. L. V. et al. Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 133-136, out. 2006.
- GOMES, A. L. V. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, 2007. *In press*.
- GRYSSELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, London, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, set. 2006.
- HAMBURGER, J. et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, p. 872-876, Dec. 1998a.
- HAMBURGER, J. et al. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 3, p. 468-473, Sep. 1998b
- HAMBURGER, J. et al. Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma Haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snails infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, 71, n. 6, p. 765-773, Nov. 2004.

- HAMILTON, J. V.; KLINKERT, M.; DOENHOFF, M. J. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. **Parasitology**, London, suppl. 117, p. S41-S57, May 1998.
- HANELT, B. et al. Detection of *Schistosoma mansoni* in Biomphalaria using nested PCR. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, p. 387-394, Feb. 1997.
- HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, Nov. 1993.
- HOKKE, C. H. et al. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of Schistosoma biology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, p. 165 - 174, Mar. 2007.
- INVITROGEN. **TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing**. Carlsbad, 2006. Disponível em: <[http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topotaseq\\_man.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topotaseq_man.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2007.
- JANNOTTI-PASSOS, L. K. et al. PCR amplification of the mitochondrial DNA mini-satellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria gabrata* snails. **Parasitology**, Cambridge, v. 83, p. 395-399, Jun. 1997.
- JANNOTTI-PASSOS, L. K. et al. Multiplex PCR for both identification of Brazilian Biomphalaria species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae). **The Journal Parasitology**, Lawrence, v. 92, p. 401 -403, Apr. 2006.
- JONHNSTON, D. A., KANE, R. A., ROLLINSON, D. Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. **Parasitology**, Cambridge, v. 2, p.147-156. 7-8. Aug. 1993.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELEGRINO, J. A simple device for quantitative stool tchick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, p. 371-373. out. 1972
- KUBISTA, M. et al. The real Time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of Medicine**, London, v. 27, p. 95-125. May 2005.
- KUNTZ, E. R. Effect of light and temperature on shedding of *Schistosoma mansoni* cercarie. **Naval Medical Research Institute (U.S.)**, Bethesda, n. 7, p. 16, Nov. 1946.

LO VERDE, P. T. et al. Schistosoma mansoni genome project: an update. **Parasitology International**, Amsterdam, n. 53, p.183-192, Jun. 2004.

MANGOLD, K. A. et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 2435-2440, May 2005.

MELO, F. L et al., Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene**, London, n. 100, p.1049 - 1055, Nov. 2006a.

MELO, F. L. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para detecção de Schistosoma mansoni**. 2006. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006b.

METZKER L. M.; CASKEY, T. C. Polymerase Chain Reaction (PCR). **Nature**, London, May 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com>>. Acesso em: 20 ago. 2006.

MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lung. **Parasitology**, London, v. 77, n. 3, p. 281-302, Dec. 1978.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 maio 2007.

NOYA, O. et al. Laboratory diagnosis of Schistosomiasis in areas of low transmission. A review of a line research. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97 supl 1, p. 167-169, jan./fev. 2002.

PARAENSE, L. W. Distribuição dos caramujos no Brasil. Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p. 117-126, fev. 1986.

PINGON, J. M. et al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, New Jersey, v. 4. n. 2, p. 83-86, Feb. 1990.

PONCHEL, F. et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**, London, v. 3, p. 3 -18. Oct. 2003.

PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, n. 2, p. 157-162, Feb. 2002.

PONTES, L. A. et al. Comparison of a polymerase chain reaction on the kato-katz technique for diagnosis infection with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, p. 652-656, Aug. 2003.

RABELLO, A.; PONTES, L. A.; DIAS-NETO, E. Recent advances in the diagnosis of Schistosoma infection: the detection of parasite DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 171-172, Abr. 2002.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M. What does the future hold for clinical microbiology? **Nature reviews/ Microbiology**, London, v. 2, p. 151-159. Feb. 2004.

RÄDSTROM, P. et al. Pre-PCR Processing. **Molecular Biotechnonology**, Washington, v. 26, n. 2, p. 133-146, Feb. 2004.

REY, L. Schistosoma e esquistossomose: epidemiologia e controle. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 35, p. 389-410.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANDOVAL, N. et al. Schistosoma mansoni: A diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Experimental Parasitology**, Cambrigde, v. 114, p. 84-88, Oct. 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSEN, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, Dec. 1997.

SMITHERS, S. R., TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, Cambridge, v. 55, p. 695 -700, Nov. 1965.

SPEERS, D. J. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. **The Clinical biochemist. Reviews**, Sidney, v. 27, p. 39-51, Feb. 2006.

TAYLOR, C. et al. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochemical Journal**, London, v. 291, p. 493-504, Apr. 1993.

TOO, H. P. et al. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular brain research**, Amesterdan, v.114, p. 146-154, Mar. 2003.

WILSON, I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3741–3751, Oct. 1997.

WILSON, R. A. 'Oming in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, p. 14 - 20, Nov. 2006.

WONG, L. M.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. **BioTechniques**, Natick, v. 39, p. 1-11, July, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Schistosomiasis. In: \_\_\_\_\_. **Tropical diseases research: progress 2004-2005**. Geneva, 2005. Special Programme for research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acesso em: 16 nov. 2006.

ZIPPER, H. et al. Investigation on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 32, p. 294-299, Nov. 2004.

---

**APÊNDICE A.1**



# Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection

Frederico GC Abath<sup>+/++</sup>, Ana Lisa do Vale Gomes, Fábio L Melo, Constança S Barbosa<sup>\*/++</sup>, Roberto P Werkhauser

Departamentos de Imunologia e \*Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Prof. Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil

*The detection of specific DNA sequences by polymerase chain reaction (PCR) has proved extremely valuable for the analysis of genetic disorders and the diagnosis of a variety of infectious disease pathogens. However, the application to the detection of Schistosoma mansoni is rare, despite a recommendation of the World Health Organization that a major focus of research on schistosomiasis should be on the development and evaluation of new strategies and tools for control of the disease. In this context, a few studies were published for the detection of the parasite in snails, monitoring of cercariae in water bodies, and diagnosis of human infection. The present minireview describes sensitive and specific PCR based systems to detect S. mansoni, indicating possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection.*

Key words: polymerase chain reaction - molecular diagnosis - schistosomiasis - transmission - snail - *Schistosoma*

Schistosomiasis is a disease transmitted by fresh water snails. It affects more than 200 million people worldwide and is endemic in 74 countries, with more than 80% of infected persons living in Africa. In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only causative species of schistosomiasis, and there are three species of intermediate hosts: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea*, and *B. tenagophila*. Adult *S. mansoni* live in the bloodstream. Their eggs pass out of the host with the faeces. In contact with water, free-swimming miracidia emerge from the egg and penetrate the soft tissues of the snail host. Within the snails, miracidia immediately differentiate into sporocysts and, as they migrate through the snail tissues, give rise to cercariae. Cercariae are shed from the snails and are infective to humans by direct penetration of the skin. Thus, molecular approaches can be used to detect DNA of different life cycle stages of *S. mansoni* by analyzing different biological samples: feces, snail tissues, and infested water bodies, resulting in diagnosis of vertebrate and invertebrate host infections, and identification of transmission sites.

The detection of specific DNA sequences by polymerase chain reaction (PCR) has proved extremely valuable for the analysis of genetic disorders and the diagnosis of a variety of infectious disease pathogens (Leal et al.

1996, Lucena et al. 1998, Schindler et al. 2001, Rodrigues et al. 2002). However, the application to the detection of *S. mansoni* is rare, despite a recommendation of the World Health Organization that a major focus of research on schistosomiasis should be on the development and evaluation of new strategies and tools for control of the disease (WHO 2004). In this context, a few studies were published for the detection of the parasite in snails (Hanelt et al. 1997, Jannotti-Passos et al. 1997, Hamburger et al. 1998a, Melo et al. 2006), monitoring of cercariae in water bodies (Hamburger et al. 1998b), and diagnosis of human infection (Pontes et al. 2002). The use of PCR for diagnosis of human infection, using fecal samples was evaluated in patients living in endemic areas (Pontes et al. 2002). However, the approaches with potential for use in the identification of transmission sites (Hanelt et al. 1997, Jannotti-Passos et al. 1997, Hamburger et al. 1998a), were neither appropriate for large scale use nor formally validated in endemic areas. The sensitive and accurate identification of human infection, and the precise monitoring of schistosome transmission sites may be important tools for the long term control of the disease. The present minireview describes the development of sensitive and specific PCR based systems to detect *S. mansoni* DNA, indicating the possible applications of these techniques.

## Detection of *S. mansoni* by PCR

*Identification of snail infection* - The identification of schistosome transmission sites involves the detection of *S. mansoni* infected snails by exposure of individual snails to artificial light and observation of cercarial shedding. Alternatively, snails may be crushed between glass slides and inspected for the presence of sporocysts. However, there are limitations to detecting the parasite in situations such as, low parasite burden, prepatent infections (detection

Financial support: Fiocruz internal funds (PDTIS), Facepe, CNPq

\*Corresponding author: fabath@cpqam.fiocruz.br

++CNPq research scholarships

Received 25 May 2006

Accepted 26 June 2006

tion of cercarial shedding is only possible 30 days after infection), aborted development of sporocysts, and death of the molluscs after collection and prior to exposure to light (Barbosa 1992, Hanelt et al. 1997), resulting in understimation of the true prevalence of infection. The conventional techniques for identification of infected snails are simple, cheap, but time consuming and associated with high operational costs because of the necessity for trained personnel and an appropriate laboratory structure; the whole process involves collection of snails in suspected areas, as well as the maintenance and analysis of individual snails. In addition, discrimination of *S. mansoni* cercariae from other trematodes can be problematic. In the particular case of *B. straminea*, even the examination of many snails from endemic areas can be negative (Barbosa & Silva 1992, Favre et al. 1995). Thus, conventional methods for the identification of transmission sites have limitations.

A nested PCR targeting the 18S rDNA of *S. mansoni* was developed for the identification of infection in snails (Hanelt et al. 1997). In another study, a PCR assay based on a highly repeated tandemly arranged DNA sequence was developed for detection of prepatent *S. mansoni* infection (Hamburger et al. 1998a). The use of PCR amplification of the minisatellite repeat from *S. mansoni* mitochondrial DNA was proposed to identify infected snails (Jannotti-Passos et al. 1997). As the latter two approaches result in a ladder profile reflecting the amplification of tandem repeats (Jannotti-Passos et al. 1997, Hamburger et al. 1998a), the possibility exists for some variation of the profile due to genetic variability, posing difficulties for the use of this procedure on large scale.

It is crucial that the assays discriminate *S. mansoni* from other parasites that may co-exist in naturally infected snails and which may pose problems for the differential diagnosis based on morphology (Chingwena et al. 2002, Hertel et al. 2003, Thiengo et al. 2004). We extended previous studies, by aligning multiple SSU rRNA sequences from vertebrate and invertebrate host, and trematodes closely related to *S. mansoni*, allowing for the design of very discriminative primers (Melo et al. 2006). Indeed, the novel PCR systems developed were highly specific for the detection of *Schistosoma* DNA, not amplifying, as suggested by multiple sequence alignment, DNA from vertebrate and invertebrate hosts of the parasite, or species representative of families of parasites commonly infecting *Biomphalaria* in Brazil (Thiengo et al. 2004).

Very recently, a PCR system targeting a specific *S. haematobium* tandemly repeated DNA sequence, termed Dra I (Hamburger et al. 2004), was used to study the dynamics of snail infection in endemic areas for schistosomiasis haematobium (Hamburger et al. 2004). A ladder pattern of amplicons was produced, and the detection limits was less than 10 fg. Nonetheless, it was based on DNA purification of individual snails, and the system was not considered practical for field use by these authors. Purification of DNA from pools of snails, followed by PCR is more appropriate for large scale screening in endemic areas. Thus, purification methods were adapted for processing pools of 25-50 *B. glabrata* (Melo et al. 2006). This decreases costs and allows for the use of molecular de-

tection tools on a large scale. To evaluate the ability of the molecular approaches in detecting snail infection under natural conditions, snail pools (including *B. glabrata* and *B. straminea*) were collected in water bodies suspected of being transmission sites of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. The PCR based methods were significantly more efficient in detecting *S. mansoni* infection than the conventional method of induction of cercaria shedding (Melo et al. 2006).

The published PCR systems aimed at detecting *S. mansoni* DNA presented detection limits ranging from 1 fg to 1 pg, and were able to identify prepatent snail infections (Hanelt et al. 1997, Jannotti-Passos et al. 1997, Hamburger et al. 1998a). Detection of prepatency would capture the summation of factors affecting water contamination by schistosome eggs, and infectivity of miracidia (Hamburger et al. 2004). It has been shown that extraction of 10 *S. mansoni* miracidia yields approximately 0.45 ng DNA (Jannotti-Passos et al. 1997). Thus, it is estimated that 1 miracidium contains ~45 pg of genomic DNA. Since the genome of *S. mansoni* contains ~580 fg, theoretically the PCR systems available can detect DNA corresponding to less than 1 miracidium, and the nested PCR variants can detect DNA corresponding to less than a single cell of the multicellular parasite *S. mansoni*.

*Identification of infested water bodies* - The risk of infection in transmission sites may be estimated by detecting infected snail capable of shedding cercariae. However, since seasonal fluctuations exist in snail population densities, infection rates, and cercarial output, information on both snail infection and presence and distribution of cercariae is required for evaluating the risk of infection (Hamburger et al. 1998b).

Schistosome cercariae are difficult to recover for identification in natural water bodies. The use of sentinel mice for this purpose is inaccurate, time consuming, and limited. Alternatively, methods for collection and morphological identification are not appropriate for large scale use. Species identification of schistosome cercariae cannot be done by morphology, and since in many endemic areas animal schistosomes may appear together with human schistosomes in the same transmission sites, species identification of schistosome cercariae is often required. To overcome the limitations of current methods for identification of cercariae in water, Hamburger et al. (1998b) developed a PCR for identifying *S. mansoni* cercariae. The relevant primers were designed based on a highly 121-bp repeated tandemly arranged DNA sequence that constitutes more than 10% of the genome of *S. mansoni* (Hamburger et al. 1991). Amplification of this sequence yields a ladder of products; the smallest band is 42 bp, and the others are progressively larger by 121-bp increments. The PCR assay should enable identification of cercariae even when the parasites are masked, or disintegrated. However, if the cercarial DNA persists for a long time in natural transmission sites, it may be detectable even after snails shedding cercariae are no longer present. The technique was able to detect 10 fg of *S. mansoni* DNA, and consequently, a single cercaria suspended in water or trapped on a filter (Hamburger et al. 1998b). Thus, this approach may be

useful for the definition of the distribution of cercariae in a site. Although the assay seems to be specific, testing additional non-schistosome trematodes is still required for establishing the species-specificity (Hertel et al. 2004).

**Diagnosis of human infection** - The Kato-Katz parasitologic technique is currently the recommended method for diagnosing schistosomiasis mansoni because it is quantitative, relatively inexpensive, and simple (Katz et al. 1972). However, the sensitivity of this technique decreases when the prevalence and intensity of infection are low (Ebrahim et al. 1997). Thus, this method is less efficient in areas of low endemicity, in post-treatment situations, and in the control of transmission. The usefulness of PCR for detecting *S. mansoni* DNA in human fecal samples was described (Pontes et al. 2002). These authors designed primers to target a tandem repeat DNA sequence of *S. mansoni* described previously (Hamburger et al. 1991). The specificity of this test was demonstrated by the absence of amplification when DNA from other helminthes (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Taenia solium*, and *Trichiuris trichiuria*), commonly infecting people in endemic areas for schistosomiasis were tested. Using an artificially prepared positive fecal sample, PCR was able to detect *S. mansoni* DNA in fecal samples containing 2 eggs/g, an amount not detectable by the Kato-Katz examination (detection limit = 20 eggs/g). Subsequently, the same group reported the results of a more extensive comparison between the PCR assay and the parasitologic Kato-Katz technique, using fecal samples collected from individuals living in a Brazilian endemic area (Pontes et al. 2003). The prevalence of *S. mansoni* infection, calculated with one, two, or three Kato-Katz examinations were 25.3, 29.4, and 30.9%, respectively. The prevalence observed using the PCR technique was 38.1, 13% higher than that determined with one Kato-Katz examination (Pontes et al. 2003). Taken collectively these data (Pontes et al. 2002, 2003) indicate that PCR detection of *S. mansoni* eggs in fecal samples is more sensitive than the conventional parasitological approach. Probably the molecular approach will not replace the conventional parasitological examination, due to the need of more sophisticated laboratory equipments and well trained personnel, and, consequently, operational costs. In addition, conventional PCR does not allow for quantification of parasite burden. Nonetheless, the PCR technique might prove to be especially useful in circumstances of lower intensity or prevalence of infection (Pontes et al. 2003), a condition for which the parasitologic examination shows a well-documented limitation of its sensitivity (Ebrahim et al. 1997).

The possibility of detecting *S. mansoni* DNA in sera of schistosomiasis patients was suggested (Pontes et al. 2002). However, the number of reported positive samples were very small, and it was not clear how many serum samples had been tested. Thus, it is still not demonstrated that there is enough free *S. mansoni* DNA in these kind of clinical samples to make them useful for PCR detection. We are currently investigating this issue by quantitative real time PCR (unpublished results). One of the advantages of real time PCR over conventional PCR is the pos-

sibility to quantify parasite DNA in the samples, an indirect measure of the parasite burden.

## Conclusions

In conclusion, the PCR systems available are sensitive, and have the potential to detect parasite DNA in snails, monitoring of cercariae in water bodies, and diagnosis of human infection. However, more extensive validation studies in endemic areas are crucial to fully investigate the suitability of the tools for these purposes, with benefits for the control of schistosomiasis. Quantitative real time PCR for *S. mansoni* detection, would have the additional advantage of estimating the parasite burden of the infection. Although the cost per reaction is still relatively high, the reagents and equipments for molecular techniques are becoming cheaper, making the discussion concerning high cost less relevant.

## REFERENCES

- Barbosa CS 1992. Methods for malacological work in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. IV): 311-312.
- Barbosa CS, Silva CB 1992. Epidemiologia da esquistossomose mansonica no Engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. *Cad Saúde Públ* 8: 83-87.
- Chingwena G, Mukaratirwa S, Kristensen TK, Chimbari M 2002. Susceptibility of freshwater snails to the amphistome *Calicophoron microbothrium* and the influence of the species on susceptibility of *Bulinus tropicus* to *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mattheei* infections. *J Parasitol* 88: 880-883.
- Ebrahim A, El-Morshedy H, Omer E, El-Daly S, Barakat R 1997. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 57: 706-708.
- Favre TC, Bogea THP, Rotenberg L, Silva HS, Pieri OS 1995. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 565-567.
- Hamburger J, He N, Xin XY, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A 1998a. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. *Am J Trop Med Hyg* 59: 872-876.
- Hamburger J, Hoffman O, Kariuki HC, Muchiri EM, Ouma JH, Koech KK, Sturrock RF, King CH 2004. Large-scale polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. *Am J Trop Med Hyg* 71: 765-773.
- Hamburger J, Turetske T, Kapeller I, Deresiewicz R 1991. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol Biochem Parasitol* 44: 73-80.
- Hamburger J, Yu-Xin X, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A 1998b. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am J Trop Med Hyg* 59: 468-473.

- Hanelt B, Adema CM, Mansour MH, Loker ES 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J Parasitol* 83: 387-394.
- Hertel J, Haberl B, Hamburguer JHW 2003. Description of a tandem repeated DNA sequence of *Echinostoma caproni* and methods for its detection in snail and plankton samples. *Parasitology* 126: 443-449.
- Hertel J, Kedves K, Hassan AHM, Haberl B, Haas W 2004. Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR. *Acta Trop* 91: 43-46.
- Jannotti-Passos LK, Vidigal THDA, Dias-Neto E, Pena SDJ, Simpson AJG, Dutra WO, Souza CP, Carvalho-Parra JF 1997. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology* 83: 395-399.
- Katz N, Chaves A, Pelegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14: 397-400.
- Leal NC, Abath FGC, Alves LC, de Almeida AM 1996. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 38: 371-373.
- Lucena WA, Dhalaria R, Abath FGC, Nicolas L, Regis LN, Furtado AF 1998. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaraemic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 290-293.
- Melo FL, Gomes ALG, Barbosa CS, Werkhauser RP, Abath FGC 2006. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (in press).
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello ALT 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg* 66: 157-162.
- Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the kato-katz technique for diagnosis infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 68: 652-656.
- Rodrigues EHG, Brito MEF, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, Albuquerque MFPM, Jardim ML, Abath FGC 2002. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 3572-3576.
- Schindler HC, Montenegro L, Montenegro R, Carvalho AB, Abath FGC, Jaureguiberry G 2001. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *Am J Trop Med Hyg* 65: 355-361.
- Thiengo SC, Mattos AC, Boaventura FM, Loureiro MS, Santos SB, Fernandez MA 2004. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V - Norte Fluminense Mesoregion. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 99-103.
- WHO 2004. World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. TDR home page at <http://www.who.int/tdr/>.



---

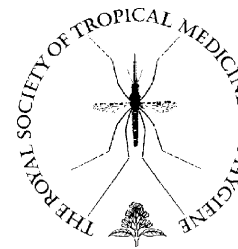
**APÊNDICE A.2**



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: [www.elsevierhealth.com/journals/trst](http://www.elsevierhealth.com/journals/trst)



# Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis

Fábio L. Melo<sup>a,1</sup>, Ana Lisa do Vale Gomes<sup>a,1</sup>, Constança S. Barbosa<sup>b</sup>, Roberto P. Werkhauser<sup>a</sup>, Frederico G.C. Abath<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães—FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães—FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil

Received 19 October 2005; received in revised form 7 December 2005; accepted 8 December 2005  
Available online 18 April 2006

## KEYWORDS

Schistosomiasis;  
*Schistosoma mansoni*;  
Molecular diagnosis;  
PCR;  
Transmission;  
Snail

**Summary** Primers targeting the gene encoding the small subunit rRNA were designed to amplify DNA from *Schistosoma mansoni* with high specificity. Three PCR systems were developed: conventional PCR, two-step nested PCR (NPCR) and single-tube nested PCR (STNPCR). The limits of detection of parasite DNA for the conventional PCR, NPCR and STNPCR were 10 pg, 0.1 fg and 1 fg, respectively. The assays were highly specific for *S. mansoni* and did not recognise DNA from closely related non-schistosome trematodes. Using pools of *Biomphalaria* molluscs, PCR, NPCR and STNPCR were positive in 6/16 (37.5%), 15/16 (93.8%) and 13/16 (81.3%) of the tested samples, respectively, whereas the observation of cercariae shedding after exposure to light was able to detect *S. mansoni* infection in 6/16 (37.5%) of the pools. Thus, the molecular detection systems had a higher level of sensitivity than standard screening of intermediate hosts by cercarial shedding when DNA was purified from pools of snails collected from endemic areas. These PCR protocols have potential to be used as tools for monitoring of schistosome transmission.

© 2006 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Schistosomiasis is a disease transmitted by fresh water snails. It affects more than 200 million people worldwide and is endemic in 74 countries, with more than 80% of

infected persons living in Africa. The WHO recommends that a major focus of research on schistosomiasis should be on the development and evaluation of new strategies and tools for control of the disease (WHO, 2004).

In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only causative species of schistosomiasis and there are three species of intermediate hosts: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* and *B. tenagophila*. *Biomphalaria glabrata* is considered to be the most efficient intermediate host owing to its high susceptibility to infection. In contrast, *B. straminea* is highly resistant to infection by *S. mansoni* and, when infected,

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 2101 2558; fax: +55 81 3453 2449.

E-mail address: [fabath@cpqam.fiocruz.br](mailto:fabath@cpqam.fiocruz.br) (F.G.C. Abath).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the paper.

produces fewer cercariae (Barbosa, 1992). None the less, *B. straminea* is important in transmission owing to its wide geographical distribution and its ability to invade and colonise a variety of different ecological niches. Indeed, *B. straminea* is the predominant intermediate host in many areas of high disease prevalence (Favre et al., 1995).

Identification of schistosome transmission sites involves the detection of *S. mansoni*-infected snails by exposure of individual snails to artificial light and observation of cercarial shedding. Alternatively, snails may be crushed between glass slides and inspected for the presence of sporocysts. However, there are limitations to detecting the parasite in situations such as prepatent infections, aborted development of sporocysts, infection with other trematodes and death of the molluscs after collection and prior to exposure to light (Hanelt et al., 1997), resulting in underestimation of the true prevalence of infection.

Although PCR-based techniques have been reported for the diagnosis of a number of infectious pathogens, application to the detection of *S. mansoni* is rare. In this context, a few studies have been published for the detection of the parasite in snails (Hamburger et al., 1998a; Hanelt et al., 1997; Jannotti-Passos et al., 1997), monitoring of cercariae in water bodies (Hamburger et al., 1998b) and diagnosis of human infection (Pontes et al., 2002). However, the approaches with potential for use in the identification of transmission (Hamburger et al., 1998a; Hanelt et al., 1997; Jannotti-Passos et al., 1997) were neither appropriate for large-scale use nor formally validated in endemic areas. Sensitive and accurate identification of schistosome transmission sites by detecting infection in the snail vector will be important for the long-term control of the disease. The present paper reports on the development of sensitive and specific PCR-based systems to detect *S. mansoni* infection in pools of snails. These systems are potentially useful for large-scale monitoring of transmission foci in endemic areas.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Primers

Sequences of small subunit (SSU) rRNA of *Schistosoma* spp., *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *B. glabrata* and other molluscs were aligned using tools available at the European ribosomal RNA database (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>), maintained by the University of Gent, Belgium, and using Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). This allowed the selection of possible targets for PCR amplification. Target regions were further refined by additional alignment of sequences from trematodes closely related to *S. mansoni*. Primers were judiciously designed using the software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) so that *S. mansoni* DNA could be discriminated from other closely related parasites, and particular attention was given to the 3' end of the primers. The primers Schfo11 (5'-GTTACGATCAGGACAGTGT-3'), Schfo17 (5'-GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC-3') and Schre19 (5'-CTAAACGAGCACAGAGGAC-3') were specific for *S. mansoni*, whereas primers Unvfo2 (5'-TGGAGGGCAAGTCTGGT-3'),

Unvre6 (5'-GGTGAGTTCCCGTGTGAGT-3') and Unvre16 (5'-CCGGACATCTAAGGGCATCA-3') were based on highly conserved regions identified by alignment of sequences from a great number of different species.

### 2.2. Purification of samples

*Schistosoma mansoni* strain LH was routinely maintained at the Laboratory of Schistosomiasis (Department of Parasitology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brazil) in outbred albino mice and in *B. glabrata* snails. Mice were infected by subcutaneous injection of approximately 350 cercariae and snails were infected by overnight exposure to 10 miracidia/snail. Adult worms were obtained by liver perfusion (Smithers and Terry, 1965). Schistosome DNA was purified using the GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions.

DNA samples from *Echinostoma paraensei*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum*, *Cercaria minensis*, *C. macrogranulosa* and *C. caratinguensis* were kindly provided by A. Maldonado (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro), G. Oliveira and O. Carvalho (Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte).

For the purification of DNA from pools of 50 *B. glabrata* snails, a phenol–chloroform method was adapted (Sambrook et al., 1989). To decrease the amount of snail tissue to be purified, the cephalopodal and visceral masses (containing the ovotestis and hepatopancreas) were excised for DNA extraction. The material from 50 snails was homogenised in 10 ml of lysis solution (10 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl, pH 8.0). Following a brief centrifugation (2000 × g), the supernatant was extracted with phenol–chloroform and precipitated with isopropanol. The pellet was then re-suspended in 1 ml of TE buffer. Two microlitres of the purified sample was used for PCR.

### 2.3. Collection of snails from suspected transmission sites

On the basis of preliminary field observations, survey sites were selected as obvious and discrete water contact points and included several different urban seasonal (temporary) transmission sites of Pernambuco State, northeastern Brazil. Most of the pools were composed of *B. glabrata*, although a few *B. straminea* pools were also studied.

### 2.4. Diagnosis of snail infection by induction of cercariae shedding

Individual snails were kept in receptacles with dechlorinated water and exposed to artificial light for 1 h. The shedding of cercariae was determined microscopically (Barbosa, 1992).

### 2.5. Conventional PCR

A 50 µl PCR reaction mixture for conventional PCR was prepared containing 10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml

gelatin, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 50 pmols of each primer and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Then, 2 µl of the DNA solution was added into the PCR mixture. Amplifications were carried out in 0.5 ml PCR tubes using an Eppendorf MasterCycler Gradient thermocycler™ (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Programmes were run for 30 cycles, consisting of denaturation at 92 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min. The tubes were heated at 92 °C for 3 min before cycling. Several positive (10 pg and 10 fg of *S. mansoni* DNA) and negative (no template) controls were included each time PCR was undertaken to detect variation in sensitivity and false-positive results due to contamination.

## 2.6. Two-step nested PCR (NPCR)

NPCR was performed using the same reaction mixture and cycling conditions as reported in Section 2.5 for conventional PCR, except that the outer primers annealed at 65 °C. Fifty picomoles of outer primers (Schfo11 and Unvre16) were used in the first PCR, and 50 pmols of internal primers (Schfo17 and Schre19) were used in the second PCR. Two microlitres of the product of the first PCR was used as template for the second PCR.

## 2.7. Single-tube nested PCR (STNPCR)

Amplifications were carried out in 0.5 ml PCR tubes using an Eppendorf MasterCycler Gradient thermocycler™, essentially as described previously (Abath et al., 2002). Briefly, the reaction was optimised for concentrations of deoxynucleoside triphosphates, Mg<sup>2+</sup>, and outer and inner primers. For the optimisation of primer pair studies, STNPCR assays were set up using 1 ng and 100 pg of purified *S. mansoni* DNA as template and various primer pair ratios. The relative amounts of long, short and intermediate amplification products were determined by agarose gel electrophoresis so that the best yield of the targeted product could be achieved. Based on these experiments, an outer primer set/internal primer set ratio of 1:10 (5 pmols:50 pmols) was selected in all subsequent experiments. Ten microlitres containing 50 pmols of inner primers (Schfo17 and Schre19) with traces of bromophenol blue were previously immobilised onto the inside of the microtube cap by incubating the tubes at 37 °C until the solution had dried. The first amplification round consisted of 15 cycles (92 °C for 30 s, 65 °C for 30 s and 72 °C for 1 min), whereas the second round of amplification consisted of 45 cycles (the annealing temperature was decreased to 55 °C). The first amplification round of the STNPCR was performed in a 50 µl volume containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 5 pmols of outer primers (Schfo11 and Unvre16) and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase. Then, 2 µl of the DNA solution was added into the PCR mixture. After the first round of PCR, the thermocycler was paused at 92 °C and the closed tubes were inverted several times to dissolve the inner primers inside the cap, briefly centrifuged and returned to the machine for the second round of amplification.

## 2.8. Determination of the detection limit

A log<sub>10</sub> dilution series of purified DNA from *S. mansoni* was amplified to assess the limits of detection of the PCR assays. For a rough estimate of the detection limit in pools of snails, the tissue pools were spiked with known amounts of *S. mansoni* DNA before processing of the samples.

## 2.9. Analysis of specificity

Several parasites closely related to *S. mansoni* and potentially infective to snails were analysed. As we had access to a limited range of non-schistosome trematodes for experimentation, the study was complemented by a theoretical analysis of SSU rRNA sequences from a number of parasites.

## 2.10. PCR product analysis

PCR products (10 µl) were separated by electrophoresis in 1% agarose gels and ethidium bromide-stained gels were visualised and photographed over an ultraviolet light using the MP4+ Polaroid System™ (Sigma, St Louis, MO, USA).

## 2.11. Statistical analysis

The positive frequencies were compared by McNemar's test (Armitage, 1971). Differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

# 3. Results

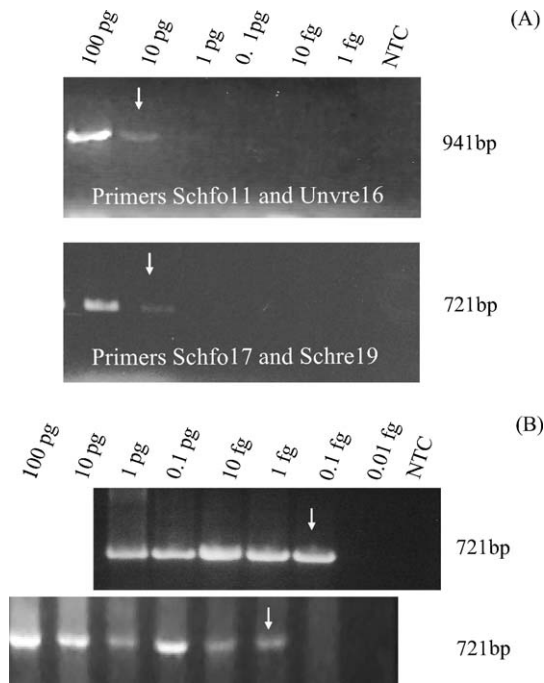
## 3.1. Detection limit of the PCR-based systems

The detection limit of 30-cycle conventional PCR was 10 pg of *S. mansoni* genomic DNA (Figure 1A). STNPCR and NPCR were more sensitive than conventional PCR, displaying detection limits of 1 fg and 0.1 fg of parasite DNA, respectively (Figure 1B). Thus, STNPCR and NPCR are potentially 10 000 and 100 000 times more sensitive than conventional PCR, respectively.

## 3.2. Detection limit in pools of snails

A purification method based on phenol-chloroform extraction was adapted for processing pools of 25–50 *B. glabrata* snails. Ten-fold dilutions of *S. mansoni* DNA, ranging from 400 ng to 0.4 pg, were added to pools of 25 snails before purification. For PCR, 0.2% of the purified samples was analysed. The conventional PCR was able to detect 40 ng of schistosome DNA per pool of 25 snails (80 pg/reaction), whereas NPCR and STNPCR were more sensitive, detecting schistosome DNA in pooled snails containing 0.4 ng and 4 ng of parasite DNA per snail pool (0.8 and 8 pg/reaction), respectively (data not shown). The discrepancies observed in comparison with the experiments carried out with *S. mansoni* purified DNA can be ascribed to losses during the purification procedure and the possible presence of PCR inhibitors in the preparations derived from pools of snails.



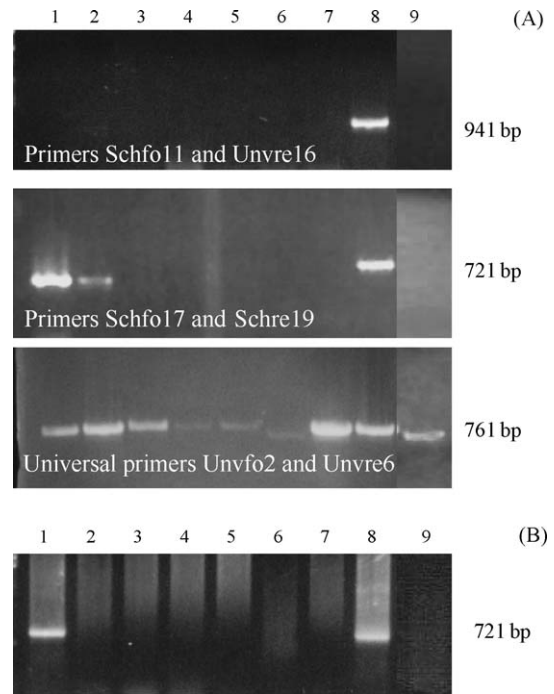


**Figure 1** Agarose gel electrophoresis showing the detection limit of the PCR systems: (A) conventional PCR with the primer sets indicated and (B) nested PCR (top) and single-tube nested PCR (bottom). For the nested PCR variants, Schfo11 and Unvre16 were used as external primers, and Schfo17 and Schre19 as internal primers. The amounts of *Schistosoma mansoni* genomic DNA are indicated. The vertical arrows indicate the detection limit. The number on the right side indicates the amplicon size. NTC, non-template control.

### 3.3. Specificity of the PCR-based systems

The authenticity of the amplified products was checked by sequencing, in which the sequences obtained perfectly matched sequences of the *S. mansoni* rRNA gene available in databanks. The novel PCR systems developed were highly specific for the detection of *Schistosoma* DNA. DNA from vertebrate (data not shown) or invertebrate hosts of the parasite was not amplified (Figure 2). In addition, several parasites closely related to *S. mansoni* were experimentally analysed, such as *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum*, *C. minensis*, *C. macrogranulosa*, *C. caratinguensis* and *E. paraensei*. As can be seen in Figure 2, the PCR system based on the primers Schfo11 and Unvre16 amplified only *S. mansoni* DNA, whereas the use of the primer pair Schfo17 and Schre19 was less discriminating, also amplifying DNA from *S. bovis* and *S. haematobium*. The use of primers Schfo11 and Unvre16 as external primers, and Schfo17 and Schre19 as internal primers in nested PCR resulted in the amplification of *S. mansoni* and *S. haematobium*. None of the other trematodes were amplified by these systems. When conserved primers were used, amplicons were obtained from all species analysed, indicating that the samples were appropriate for PCR.

In addition, a number of SSU rRNA sequences from closely related trematodes were analysed by multiple alignment (Figure 3). Although this theoretical analysis does



**Figure 2** Agarose gel electrophoresis showing the specificity of amplification (100 pg of DNA was used): (A) conventional PCR (primer sets used are indicated); and (B) nested PCR. Lane 1: *Schistosoma haematobium*; lane 2: *S. bovis*; lane 3: *S. japonicum*; lane 4: *Cercaria minensis*; lane 5: *C. macrogranulosa*; lane 6: *C. caratinguensis*; lane 7: *Echinostoma paraensei*; lane 8: *S. mansoni*; lane 9: *Biomphalaria glabrata*.

not substitute for experimental studies of specificity, it shows that the primers designed, particularly Schfo11 and Schfo17, are significantly divergent from sequences of non-schistosome species. The percent identities between the annealing regions of these primers in *S. mansoni* and the other species are shown in Figure 3.

### 3.4. Detection of *Schistosoma mansoni* infection in pools of snails from suspected transmission sites of schistosomiasis

Initially, snails experimentally infected with miracidia were detected as being infected using the PCR-based methods, whereas pools of uninfected snails were consistently negative (not shown).

To evaluate whether these molecular approaches were able to identify natural infections, *B. glabrata* and *B. straminea* snails were collected from different urban seasonal transmission sites in Pernambuco. Each pool was assigned an identification code and tested by the conventional method (observation of cercariae shedding) and subsequently by the molecular approaches described here, allowing the comparison of shedding and PCR-positive rates in the same pools of snails. To minimise false negatives due to PCR inhibitors, the samples were tested at different dilutions (1:10 and 1:100). It must be noted that evaluation of snails after elimination of cercariae may underestimate the sensitivities of the molecular assays.

Primer Schfol1 (sense)	GTTACGATCAGACCAGTGT	Percent identity
<i>S. mansoni</i>	CGGTTTTGGTTACGATCAGACCAGTGTTCAGCTCGGTGTAGTG 734	20/20 (100%)
<i>S. bovis</i>	CGGTTTTGGTTACGATCAGGAC--GTGTTTCAGCTCGGTGTAGTG 646	18/20 (90%)
<i>S. haematobium</i>	CGGTTTTGGTTACGATCAGGAC--GTGTTTCAGCTCGGTGTAGTG 732	18/20 (90%)
<i>S. japonicum</i>	CGGTTCTGGTTACGATCAGGGC-AGTGGTCAGCTCGGCGTAGTG 581	17/20 (85%)
<i>Trichobilharzia</i> sp.	CGGTTTTGGTTACGATCAGAACTTGTGTTCCGGCTCGGTGTAGTG 716	17/20 (85%)
<i>Apharingostrigea cornu</i>	TGGCTTCGGTCA-GTTCTATGT-----GATGATGAGGTG 714	6/20 (30%)
<i>Diplostomum spathaceum</i>	TGATTTCCGGTCA-GTTTCAGGC-----GATGGTAAAGTG 714	7/20 (35%)
<i>Clinostomum marginatum</i>	AGATTT-GGTTA--AACCGGGCTGATGTTCAAGTTGGTGTAGTG 722	12/20 (60%)
<i>Calicophoron calicophoron</i>	CGGTTT-GGTTACGACCCGATGAGTTCATGAGTCGGTGTAGTG 737	12/20 (60%)
<i>Maritrema oocysta</i>	CAGGCTCGGCTTCGGTTCGG-TCGGGTTGTGAGTCGGTTTCGTG 715	11/20 (55%)
<i>Echinostoma caproni</i>	GTGATCTGGTTACGACCCGATCAAGCTGCGAGTCGGTCTAGTG 736	13/20 (65%)
<i>Fasciola hepatica</i>	CTGGCTTGGTTACTCCGGGTTGAGCTTCGAGTTCGGTCTCGTG 713	11/20 (55%)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	-----CGGCTCACTGCC--GTTG----- 709	5/20 (25%)
<i>Homo sapiens</i>	-----CGAGCCACCGCC--GTC----- 834	5/20 (25%)
<b>Primer Schfol17 (sense)</b>	<b>GTGCTGGTGGG--TTGACGAGTTC</b>	<b>Percent identity</b>
<i>S. mansoni</i>	ACGGGTGCTGGTGGG--TTGACGAGTTC---GTCTTGTGAC---CT 808	22/22 (100%)
<i>S. bovis</i>	ACGGGTGCTGGTGGG--TTGACGAGTTC---GTCTTGTGAC---CT 717	22/22 (100%)
<i>S. haematobium</i>	ACGGGTGCTGGTGGG--TTGACGAGTTC---GTCTTGTGAC---CT 803	22/22 (100%)
<i>S. japonicum</i>	ACAGGTGTCGATGGG--TTAATGAGTATGTATCTTATTGAC---CT 660	15/22 (68%)
<i>Trichobilharzia</i> sp.	ACGGGTGCTGACCGAGATGGGTGAGTTTA--TTCTTGCCCGCTATCT 792	15/22 (68%)
<i>Apharingostrigea cornu</i>	GCAGGTGTCGATAG--TCCGTGGGCTT---GCTCGCTGGC---TA 783	11/22 (50%)
<i>Diplostomum spathaceum</i>	GCAGGTGTCGCTGG--TTGGTGGGCTT---GCTTGTGAC---CA 783	14/22 (64%)
<i>Clinostomum marginatum</i>	ACGGGTGCTGACTGGG--TTGATGAGCTT---GTCTTGTAAAC---CT 793	16/22 (73%)
<i>Calicophoron calicophoron</i>	ACAGGTGCTGGTG-GA-TTGTGGGTTT---GCCCTTCAGT---CT 805	18/22 (82%)
<i>Maritrema oocysta</i>	ACAGGTGTCGATG-G-----TTCA-T--CC- 768	8/22 (36%)
<i>Echinostoma caproni</i>	ACAGGTGTCAGCTGA-CTGGTGGGCTT---GCCTGCTGGT---CT 804	11/22 (50%)
<i>Fasciola hepatica</i>	ACAGGTGTCAGCTGA-CTGGTGGGCTT---GCCTGCTAGT---CTT 782	11/22 (50%)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	-----G-----CCGGC----- 730	0/22 (0%)
<i>Homo sapiens</i>	-----C-----TCGGC----- 850	0/22 (0%)
<b>Primer Schre19 (antisense)</b>	<b>GTCCTCTGTGCTCGTTTATG</b>	<b>Percent identity</b>
<i>S. mansoni</i>	CTTTAACCTGCTAAATAGTAGACTGGTCCCTCTGTGCTCGTTTAGGGCGCG 1497	19/19 (100%)
<i>S. bovis</i>	CTTTAACCTGCTAAATAGTAGACTGGTCCCTCTGTGCTCGTTTAGGGCGCG 1409	19/19 (100%)
<i>S. haematobium</i>	CTTTAACCTGCTAAATAGTAGACTGGTCCCTCTGTGCTCGTTTAGGGCGCG 1495	19/19 (100%)
<i>S. japonicum</i>	CTTTAACCTACTAAATAGTAGACTGGTCCCTCTGTGCTCGTTTAGGGCGCG 1352	18/19 (95%)
<i>Trichobilharzia</i> sp.	CTTTAACCTACTAAATAGTAGATTGGTCCCTCTGTGCTCGTTTAGGGCGCG 1484	18/19 (95%)
<i>Apharingostrigea cornu</i>	CTTTGACCTACTAATAGTTTGGCTATCCCTCTGTGCTCGTGCAGGCTCG 1475	16/19 (84%)
<i>Diplostomum spathaceum</i>	CTTTGACCTACTAATAGTTTGGCTATCCCTCTGTGCTCGTGCAGATCTCG 1475	16/19 (84%)
<i>Clinostomum marginatum</i>	CTTTGACCTACTAATAGTAGCTCGTCCCTCTGTGCTCGTGCAGGCTCG 1485	17/19 (89%)
<i>Calicophoron calicophoron</i>	CTCTGGCCTGCTAAATAGTAGTCCCTCTGTGCTCGTGCAGGCTCG 1497	15/19 (79%)
<i>Maritrema oocysta</i>	CTTTGGCCTGCTAAATAGTAGTCCCTCTGTGCTCGTGCAGGCTCG 1457	17/19 (89%)
<i>Echinostoma caproni</i>	CTTTGGCCTGCTAAATAGTAGTCCCTCTGTGCTCGTGCAGGTTACG 1496	17/19 (89%)
<i>Fasciola hepatica</i>	CTCTGGCCTGCTAAATAGTAGTCCCTCTGTGCTCGTGCAGGTTGCG 1474	17/19 (89%)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	CTTAGCCTATTAATAGTTCCGGTTCCTCG-----ATGGCCG 1412	4/19 (21%)
<i>Homo sapiens</i>	CTCTGGCATGCTAACTAGTTACGCGAC-CCCCG-----AGCGGTGCG 1529	3/19 (16%)

**Figure 3** Multiple alignment of regions of the small subunit rRNA gene targeted by the primers used in the PCR. Nucleotides or dashes in grey shaded background indicate discrepancies regarding the primers sequence.

Table 1 details the diagnostic results and characteristics of the pools of snails studied. PCR, NPCR and STNPCR were positive in 6/16 (37.5%), 15/16 (93.8%) and 13/16 (81.3%) of the tested samples. The positivity rates of NPCR and STNPCR were higher compared with PCR ( $P=0.008$  and  $P=0.023$ , respectively) as well as compared with the shedding method ( $P=0.016$  and  $P=0.023$ , respectively). Although the percentages of positivity of PCR and the conventional shedding method were similar, PCR was positive in three snail pools that were negative by the conventional method.

#### 4. Discussion

The conventional techniques for identification of infected snails are simple and cheap but are time consuming. In addition, prepatent infections cannot be detected and discrimination of *S. mansoni* cercariae from other trematodes can be problematic. In the particular case of *B. straminea* that is

resistant to infection, even the examination of many snails from endemic areas may yield negative results (Barbosa and Silva, 1992; Favre et al., 1995). Thus, conventional methods for the identification of transmission sites have limitations.

Although NPCR is more sensitive than conventional PCR, an inherent drawback is the need to open tubes after the first round of amplification to transfer products to a new tube for a second PCR that utilises different primers (Picken et al., 1996), increasing the risk of cross-contamination of samples. With the goal of minimising the risk of cross-contamination, protocols for STNPCR were devised (Abath et al., 2002; Montenegro et al., 2004). The present report describes three sensitive and highly specific *S. mansoni* detection systems: conventional PCR, NPCR and STNPCR. It is estimated that 1 miracidium contains ~45 pg of genomic DNA (Jannotti-Passos et al., 1997). Since the genome of *S. mansoni* contains ~580 fg, theoretically our PCR systems can detect DNA corresponding to less than 1 miracidium and the

**Table 1** Characteristics of pools of snails collected from suspected transmission sites of schistosomiasis and diagnostic results

Pool	Prevalence of human infection <sup>a</sup>	No. of snails	% snails shedding cercariae	PCR	NPCR	STNPCR
PA <sup>b</sup>	Unknown	25	22	+	+	+
16A	Light	9	1.1	—	—	+
16C	Light	20	10	—	+	+
9A	Light	19	5	—	+	+
4B <sup>b</sup>	Moderate	20	0	+	+	+
5B	Moderate	26	0	+	+	+
6B	Moderate	15	0	+	+	+
6C	Moderate	3	0	—	+	+
7A	High	25	0	—	+	+
C2	Light	38	39	+	+	+
Qt29	Light	26	0	—	+	+
C3-2	Light	37	0	—	+	+
16B	High	47	55	+	+	+
Qt19 <sup>c</sup>	High	50	0	—	+	—
R1A <sup>c</sup>	High	50	0	—	+	—
R1B <sup>c</sup>	High	50	0	—	+	—
Frequency of positivity			6/16 (37.5%)	6/16 (37.5%)	15/16 (93.8%)	13/16 (81.3%)

NPCR: nested PCR; STNPCR: single-tube nested PCR.

<sup>a</sup> For the purpose of this study, prevalences of human infection were categorised as light (<25%), moderate (25–44.9%) and high (≥50%).

<sup>b</sup> Other trematodes were observed only in pool 4B and PA.

<sup>c</sup> Refers to *Biomphalaria straminea*, whereas the other pools are composed of *B. glabrata*.

nested PCR variants can detect DNA corresponding to less than a single cell of the multicellular parasite *S. mansoni*.

A nested PCR targeting the 18S rDNA of *S. mansoni* was developed for the identification of infection in snails (Hanelt et al., 1997). In another study, a PCR assay was developed for detection of prepatent *S. mansoni* infection based on a highly repeated tandemly arranged DNA sequence (Hamburger et al., 1998a). The use of PCR amplification of the minisatellite repeat from *S. mansoni* mtDNA was proposed to identify infected snails (Jannotti-Passos et al., 1997). As the latter two approaches result in a ladder profile reflecting the amplification of tandem repeats (Hamburger et al., 1998a; Jannotti-Passos et al., 1997), the possibility exists for some variation of the profile owing to genetic variability, posing difficulties for the use of this procedure on a large scale.

It is crucial that the assays discriminate *S. mansoni* from other parasites that may co-infect snails and that may pose problems for the differential diagnosis based on morphology (Chingwena et al., 2002; Hertel et al., 2003; Thiengo et al., 2004). The novel PCR systems described herein were highly specific for the detection of *Schistosoma* DNA, not amplifying, as suggested by multiple sequence alignment, DNA from vertebrate or invertebrate hosts of the parasite. In addition, several species representative of families of parasites commonly infecting *Biomphalaria* in Brazil (Thiengo et al., 2004) were analysed experimentally or theoretically, suggesting that they were not amplifiable by the PCR systems described herein.

Very recently, a PCR system targeting a specific *S. haematobium* tandemly repeated DNA sequence, termed Dra I, was used to study the dynamics of snail infection in endemic areas for *S. haematobium* (Hamburger et al., 2004). None the less, it was based on DNA purification of individual snails

and the system was not considered practical for field use by these authors. Purification of DNA from pools of snails followed by PCR as described in the present paper is more appropriate for large-scale screening in endemic areas. This decreases the number of samples to be processed as well as the costs, allowing for use on a large scale. It is assumed that there are losses during the purification procedure and that inhibitors may be present in the purified preparation of snails. In addition, a small sample fraction was analysed (0.2% of the purified sample). None the less, conventional PCR was able to produce the expected amplicon in the snail pool containing 40 ng of artificially added schistosome DNA, whereas NPCR and STNPCR were more sensitive, detecting schistosome DNA in snail pools spiked with 0.4 ng and 4 ng of schistosome DNA, respectively. This is more than satisfactory, considering that 10 miracidia yield roughly 0.45 ng of DNA (Jannotti-Passos et al., 1997).

To evaluate the ability of the molecular approaches in detecting snail infection under natural conditions, 16 snail pools were collected in water bodies suspected of being transmission sites of schistosomiasis. The conventional method of induction of cercaria shedding was able to detect *S. mansoni* infection in 37.5% of the snail pools. Although PCR yielded the same percentage of positivity, it allowed for the identification of infection in pools that were negative by the conventional method (Table 1). This can possibly be explained by the fact that PCR can detect prepatent snail infections. NPCR and STNPCR detected *S. mansoni* in 93.8% and 81.3% of the snail pools studied, respectively, and were significantly ( $P < 0.05$ ) more sensitive than PCR or the conventional method. The entire diagnostic procedure, including extraction of DNA, can be completed in 1 day. Although the cost per reaction is still relatively high, the reagents and equipment for molecular techniques are



becoming cheaper, making the discussion regarding high cost less relevant. The previously published PCR systems aimed at detecting *S. mansoni* DNA presented detection limits ranging from 1 fg to 1 pg, and were able to identify prepatent snail infections (Hamburger et al., 1998a; Hanelt et al., 1997; Jannotti-Passos et al., 1997). As our protocols have similar DNA detection limits, they are expected to have the same capacity to detect prepatent infections, although we did not formally investigate this issue. Detection of prepatency would capture the summation of factors affecting water contamination by schistosome eggs and infectivity of miracidia (Hamburger et al., 2004).

In conclusion, the systems described herein are sensitive, specific and can be used to detect parasite DNA in pools of snails. However, more extensive validation studies in endemic areas are crucial to investigate fully the suitability of the tools for reliable monitoring of transmission sites, with benefits for the control of schistosomiasis. We are currently developing a quantitative real-time PCR assay for *S. mansoni* detection, with the additional advantage of estimating the parasite burden of the infection.

#### Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This research was supported by FIOCRUZ internal funds (PDTIS). F.G.C.A. and C.S.B. are recipients of Research Scholarships from CNPq (Brazilian Research Council). We thank Rosineide Lira, Wladimir Melo and Barnabe Tabosa for technical assistance. We are grateful to Eric Loker and Paul Hagan for critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

#### References

- Abath, F.G., Melo, F.L., Werkhauser, R.P., Montenegro, L., Montenegro, R., Schindler, H.C., 2002. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. *BioTechniques* 33, 1210–1214.
- Armitage, P., 1971. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Barbosa, C.S., 1992. Malacologic diagnostic methods. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. 4), 311–312 [in Portuguese].
- Barbosa, C.S., Silva, C.B., 1992. Epidemiologia da esquistossomose mansoni no Engenho Bela Rosa, Município de Sao Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. *Cad. Saude Publica* 8, 83–87.
- Chingwena, G., Mukaratirwa, S., Kristensen, T.K., Chimbari, M., 2002. Susceptibility of freshwater snails to the amphistome *Calicophoron microbothrium* and the influence of the species on susceptibility of *Bulinus tropicus* to *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mattheei* infections. *J. Parasitol.* 88, 880–883.
- Favre, T.C., Boga, T.H.P., Rotenberg, L., Silva, H.S., Pieri, O.S., 1995. Cercarial emergence of *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 565–567.
- Hamburger, J., He, N., Xin, X.Y., Ramzy, R.M., Jourdane, J., Ruppel, A., 1998a. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 872–876.
- Hamburger, J., Yu-Xin, X., Ramzy, R.M., Jourdane, J., Ruppel, A., 1998b. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 468–473.
- Hamburger, J., Hoffman, O., Kariuki, H.C., Muchiri, E.M., Ouma, J.H., Koech, K.K., Sturrock, R.F., King, C.H., 2004. Large-scale polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 765–773.
- Hanelt, B., Adema, C.M., Mansour, M.H., Loker, E.S., 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J. Parasitol.* 83, 387–394.
- Hertel, J., Haberl, B., Hamburger, J.H.W., 2003. Description of a tandem repeated DNA sequence of *Echinostoma caproni* and methods for its detection in snail and plankton samples. *Parasitology* 126, 443–449.
- Jannotti-Passos, L.K., Vidigal, T.H.D.A., Dias-Neto, E., Pena, S.D.J., Simpson, A.J.G., Dutra, W.O., Souza, C.P., Carvalho-Parra, J.F., 1997. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology* 83, 395–399.
- Montenegro, L.M.L., Montenegro, R.A., Lima, A.S., Carvalho, A.B., Schindler, H.C., Abath, F.G.C., 2004. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus-specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 616–625.
- Picken, M.M., Picken, R.N., Han, D., Cheng, Y., Strle, F., 1996. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 489–498.
- Pontes, L.A., Dias-Neto, E., Rabello, A.L.T., 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 157–162.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, second ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
- Thiengo, S.C., Mattos, A.C., Boaventura, F.M., Loureiro, M.S., Santos, S.B., Fernandez, M.A., 2004. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V—Norte Fluminense Mesoregion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 99–103.
- WHO, 2004. World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. TDR home page. <http://www.who.int/tdr/> [accessed 2 February 2006].

---

**APÊNDICE A.3**

## Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA

Ana Lisa do Vale Gomes, Fábio L Melo, Roberto P Werkhauser, Frederico GC Abath/+

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Prof. Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil

*This report describes the development of a SYBR Green I based real time polymerase chain reaction (PCR) protocol for detection on the ABI Prism 7000 instrument. Primers targeting the gene encoding the SSU rRNA were designed to amplify with high specificity DNA from Schistosoma mansoni, in a real time quantitative PCR system. The limit of detection of parasite DNA for the system was 10 fg of purified genomic DNA, that means less than the equivalent to one parasite cell (genome ~580 fg DNA). The efficiency was 0.99 and the correlation coefficient (R<sup>2</sup>) was 0.97. When different copy numbers of the target amplicon were used as standards, the assay could detect at least 10 copies of the specific target. The primers used were designed to amplify a 106 bp DNA fragment (T<sub>m</sub> 83°C). The assay was highly specific for S. mansoni, and did not recognize DNA from closely related non-schistosome trematodes. The real time PCR allowed for accurate quantification of S. mansoni DNA and no time-consuming post-PCR detection of amplification products by gel electrophoresis was required. The assay is potentially able to quantify S. mansoni DNA (and indirectly parasite burden) in a number of samples, such as snail tissue, serum and feces from patients, and cercaria infested water. Thus, these PCR protocols have potential to be used as tools for monitoring of schistosome transmission and quantitative diagnosis of human infection.*

Key words: polymerase chain reaction (PCR) - molecular diagnosis - schistosomiasis - real-time PCR

In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only causative species of schistosomiasis, and there are three species of intermediary hosts: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea*, and *B. tenagophila*. During the course of its life cycle, *S. mansoni* differentiates into several stages. Adult schistosomes release eggs with host's feces that in contact with water gives rise to miracidia, which is the infective form for the snail hosts. Miracidia differentiate into sporocysts immediately after penetration, migrating through snail tissues, and giving rise to cercariae. Humans become infected by contact with water infested with cercariae, which are capable of actively penetrating the skin. Molecular detection of different life cycle stages of the parasite is possible, although these proposals have been scarce. Indeed, few studies were published for the detection of the parasite in snails (Hanelt et al. 1997, Jannotti-Passos et al. 1997, Hamburger et al. 1998a, Melo et al. 2006), monitoring of cercariae in water bodies (Hamburger et al. 1998b), and diagnosis of human infection (Pontes et al. 2002).

Recently, real-time PCR (polymerase chain reaction) assays have been developed for the detection of a number of infectious organisms (Bankowski & Anderson 2004). Real-time PCR is a fluorescent-based technology, which is performed in a closed system. The World Health

Organization recommends that research should concentrate on developing and evaluation of new strategies and tools for control of the disease (WHO 2006). To our knowledge this is the first report on the development of a sensitive and specific quantitative real-time PCR for the detection of *S. mansoni* DNA. This system is potentially useful for quantitating parasite burden in human infection. In addition, it can be used for sensitive and accurate monitoring of transmission sites of schistosomiasis by detecting and quantitating infection in the snail vector.

Sequences of SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) of *Schistosoma* sp., *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *B. glabrata*, and other molluscs were aligned using tools available at the European ribosomal RNA database (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>), maintained by the University of Gent, Belgium, and also using Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). This allowed the selection of possible targets for PCR amplification. Target regions were further refined by additional alignments of sequences from trematodes closely related to *S. mansoni*. Primers Schfo111 (5'-cgatcaggaccagtgttcagc-3') and Schre111 (5'-gacaggtcaacaagacgaactcg-3') were judiciously designed using the software Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI, US), so that *S. mansoni* DNA could be discriminated from other closely related parasites, and particular attention was given to the 3' end of the primers. DNA from *S. mansoni* adult worms, mice and *B. glabrata* were purified using the GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), following the instructions of the supplier.

DNA samples from *Echinostoma paraensis*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. japonicum*, *S. rhodaini*, *Cercaria minensis*, *C. macrogranulosa*, and *C. caratinguensis* were kindly provided by A Maldonado (Instituto Oswaldo Cruz-

Financial support: Fiocruz/PDTIS, Facepe, CNPq

+Corresponding author and recipient of a research scholarship from CNPq. E-mail: fabath@cpqam.fiocruz.br

Received 25 May 2006

Accepted 26 June 2006

Fiocruz, Rio de Janeiro), G Oliveira, and O Carvalho (Centro de Pesquisas René-Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte).

Real-time PCR was carried out on the ABI PRISM 7000 system (Applied Biosystems, CA, US) using the sequence unspecific SYBR Green I dye, that binds to any double stranded DNA (and ROX as passive reference). PCR products were detected with the melting curve analysis, which was subsequently performed after the PCR run, by increasing the temperature slowly from 60 to 95°C (0.1°C/s) and by measuring the fluorescence continuously. The ABI PRISM software (version 1.1) was used for the analysis and interpretation of the results. The reactions included 2 µl of the extracted DNA, primers (2.5 pmols each) and the Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, US), as well as water added to a final volume of 50 µl. The PCR was performed under the following cycling conditions: an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification (95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s). Several non template controls (NTC) and quantitative standards were included each time PCR was undertaken to detect false positive results due to contamination and to construct a standard curve. All assays were performed in duplicates.

As PCR is an exponential process, it can be described by the equation  $N_n = N_0 + (1 + \epsilon)^n$ , where  $N_n$  is the number of target molecules at cycle  $n$ ,  $N_0$  is the initial number of

target molecules,  $\epsilon$  is the efficiency of amplification, and  $n$  is the number of cycles. The efficiency of amplification ( $\epsilon$ ) of a target molecule can be calculated from the slope of the standard curve (plot of  $C_t$  versus the negative  $\log_{10}$  concentration of the target). High efficiencies of amplifications have slopes approaching the value of 3.32 for every 10-fold dilution of the target. To compare the specificities of any assays, it is critical to compare the differences in the  $C_t$  values of the defined target and the templates ( $\Delta C_t$ ) as well as the efficiencies of the amplifications of the target and templates within each assay. Hence, specificity ( $\sigma$ ) can be defined by the equation:  $\sigma = (1 + \epsilon^{\Delta C_t})$ , where  $(1 + \epsilon)$  is  $10^{1/\text{slope}}$  (Too 2003). Hence, the larger the value  $\sigma$ , the more specific the assays are in discriminating the target over the test templates. The sensitivity of the detection limit of an assay is defined by the amplification of the highest dilution of the target when compared to the formation of primer-dimer in samples without template. A log 10 dilution series of purified DNA from *S. mansoni* was amplified to assess the limits of detection of the PCR assays. In addition, the detection limit in copy numbers was determined analyzing amplicons corresponding to the target region, that were previously purified and quantified. To determine the specificity, *M. musculus*, *H. sapiens*, *B. glabrata*, and several parasites closely related to *S. mansoni*, and eventually infective to snails were

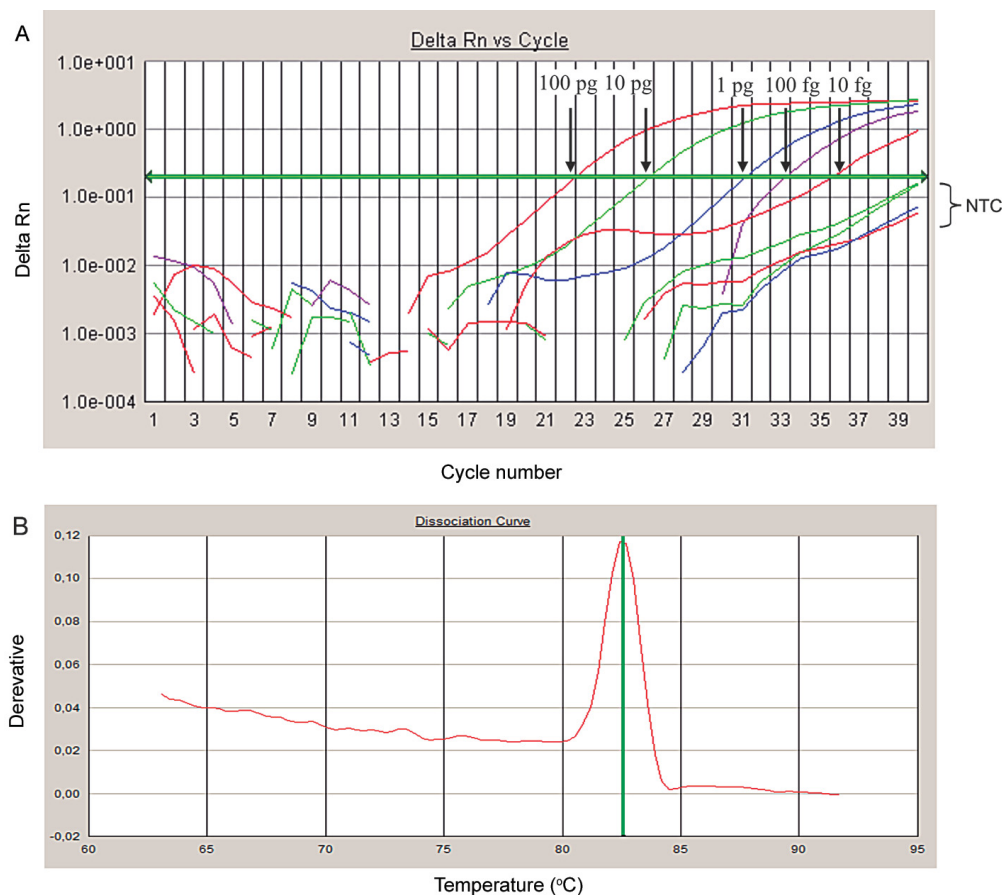


Fig. 1A: standards above the threshold are 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, and 10 fg of *Schistosoma mansoni* DNA, NTC are below the threshold; B: dissociation curve displaying a representative profile for the target amplicon. The standards and NTC are indicated.

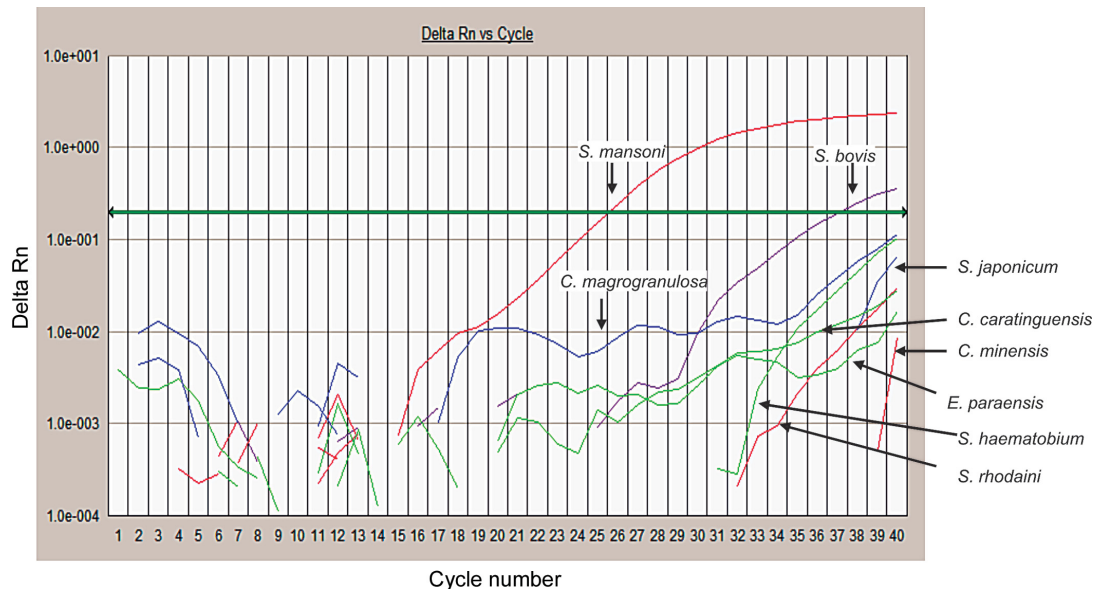


Fig. 2: representative experiment for specificity analysis. A given amount (100 pg) of DNA from *Schistosoma mansoni*, *S. bovis*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. rhodaini*, *Echinostoma paraense*, *Cercaria minensis*, *C. macrogranulosa*, and *C. caratinguensis* was tested by real time PCR. Only the amplification of *S. bovis* DNA reached the threshold, although with 3856 less specificity than amplification of *S. mansoni* DNA. Arrows indicate the curves corresponding for each of the trematodes.

analyzed. As we had access to a limited range of non-schistosome trematodes for experimentation, the study was complemented by a theoretical analysis of SSU rRNA sequences from a number of parasites.

A standard curve was constructed, resulting in a detection limit of 10 fg of *S. mansoni* genomic DNA (Fig. 1). The efficiency was 0.99 and the correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.97. When different copy numbers of the target amplicon were used as standards, the assay could detect at least 10 copies of the specific target (data not shown).

The novel PCR system developed was highly specific for the detection of *Schistosoma* DNA. As can be observed in Fig. 2, the PCR system composed by primers Schfo111 and Schre111 amplified only *S. mansoni* DNA, but not DNA from their vertebrate or invertebrate hosts. None of the other trematodes were amplified by these systems, except *S. bovis*. When universal primers were used, amplicons from all species analyzed were obtained, indicating that the samples were appropriate for PCR (data not shown).

Real-time PCR offers several advantages compared to conventional nested PCR. Real-time PCR is a closed system, in which DNA amplification and detection is carried out in a single tube or well that remain sealed during the whole PCR run. Since no post amplification processing as gel electrophoresis has to be done, the risk of carry over contamination is minimized (Bankowski & Anderson 2004). The melting curve analysis is directly and automatically performed after the PCR run within a couple of minutes, to discriminate between the specific and non-specific PCR products like primer dimers. A total PCR run, including the identification of the PCR products by melting curve analysis can be carried out within approximately 45 min. Another advantage and interesting feature of real-

time PCR is the possibility for quantitative analysis, because of the negative correlation between Ct values and number of target copies.

The *S. mansoni* real-time PCR detection system protocol developed is sensitive and highly specific. Since the genome of *S. mansoni* contains ~ 580 fg, theoretically our PCR system can detect DNA corresponding to less than a single cell of the multicellular parasite *S. mansoni*. The approach can be potentially used to detect *S. mansoni* DNA in several biological samples: human feces, snails, water. As this technique is able to accurately quantify target DNA, the approach can be useful to quantify parasite burden in human and snail infection. Indirectly, it can be used to monitor the potential of infection of transmission sites by estimating the intensity of infestation of water bodies and intensity of infection in snail.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Rosineide Lira, Wladimir Melo, and Barnabe Tabosa for technical assistance.

#### REFERENCES

- Bankowski MJ, Anderson SM 2004. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Clin Microbiol Newsletter* 26: 9-15.
- Hamburger J, He N, Xin XY, Ramzy RM, Jourdan J, Ruppel A 1998a. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. *Am J Trop Med Hyg* 59: 872-876.
- Hamburger J, Yu-Xin X, Ramzy RM, Jourdan J, Ruppel A 1998b. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am J Trop Med Hyg* 59: 468-473.



- Hanelt B, Adema CM, Mansour MH, Loker ES 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J Parasitol* 83: 387-394.
- Jannotti-Passos LK, Vidigal THDA, Dias-Neto E, Pena SDJ, Simpson AJG, Dutra WO, Souza CP, Carvalho-Parra JF 1997. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology* 83: 395-399.
- Melo FL, Gomes ALG, Barbosa CS, Werkhauser RP, Abath FGC 2006. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (in press).
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello ALT 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg* 66: 157-162.
- Too HP 2003. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 114: 146-154.
- WHO 2006. World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. TDR home page at <http://www.who.int/tdr/>.

---

**ANEXO A**

**Título do Projeto:** Identificação de focos de transmissão para esquistossomose através da detecção molecular de moluscos vetores infectados com *Schistosoma mansoni*

**Pesquisador responsável:** Ana Lisa do Vale Gomes

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/FIOCRUZ

**Data de apresentação ao CEP:** 03/07/2007

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 57/07

**Registro no CAAE:** 0057.0.095.000-07

### PARECER Nº 038/2007

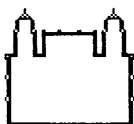
O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 06 de agosto de 2007.

  
Dra. Zulmira Maria de Medeiros  
Biomedica  
Coordenadora  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

---

**ANEXO B**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Presidência

Memo nº 037/06 – GESTEC/PR

Rio de Janeiro, 06 de Dezembro de 2006.

De: Maria Celeste Emerick  
Coordenação de Gestão Tecnológica – GESTEC

Para: Drs.: Frederico Abath – Departamento de Imunologia – CpqAM  
Ana Lisa do Vale Gomes - Departamento de Imunologia – CpqAM  
Roberto Pereira Werkhauser - Departamento de Imunologia – CpqAM

**A/C: Dr. Frederico Abath – Departamento de Imunologia – CpqAM**

**Ref.: Cópia do Pedido de Patente depositado no Brasil**

Prezado Dr Frederico,

Vimos através deste, encaminhar em anexo a cópia do pedido de patente sob nº PI 0604953-2, de título “Método, Kit e iniciadores para a identificação quantitativa de seqüências de nucleotídeos de *Schistosoma mansoni* através de PCR em tempo real”, depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial - Brasil.

Solicitamos a sua gentileza em fornecer cópia para cada inventor.

Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,

Maria Celeste Emerick  
Coordenadora de Gestão Tecnológica  
Presidência - Fiocruz