



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Eduardo Henrique Matos Pires

**A EVOLUÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA**

Recife

2021

Eduardo Henrique Matos Pires

**A EVOLUÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA**

Trabalho de conclusão de curso como parte das exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, submetido à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Recife, 13 de dezembro de 2021.

Orientadores:

Doutora Elaine Christine Gomes

Professor Doutor Martín Alejandro Montes

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P667d Pires, Eduardo
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA: UMA REVISÃO DA
LITERATURA / Eduardo Pires. - 2021.
39 f.

Orientador: Martin Alejandro Montes.
Coorientadora: Elaine Christine de Souza Gomes.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

1. Esquistossomose mansônica. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Kato-Katz. I. Montes, Martin Alejandro,
orient. II. Gomes, Elaine Christine de Souza, coorient. III. Título

CDD 574

Prof. Dr. Martín Alejandro Montes

UFRPE

Dra. Elis Dionísio da Silva

Fiocruz-PE

Dr. Walter Lins Barbosa

Fiocruz-PE

Eduardo Henrique Matos Pires

Aluno- UFRPE

Recife

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, dedico esta monografia e minha jornada até aqui aos meus avós Adalberto Matos e Júlia Matos. Afinal, foram eles que lutaram para que as próximas gerações, incluindo a minha, pudessem ter acesso à educação. Seria simplista de mais me ater apenas ao fato do trabalho e luta que eles representaram. Foram Julinha e Adalberto, pais e avós, seio e lar para os Matos que vieram depois deles. Eram ensinamentos, histórias, cocada, teimosia e acima de tudo eram amor.

Agradeço também às mães que tive a oportunidade de ter. Minha mãe biológica Beta, que nunca desistiu de mim, mesmo quando disseram para desistir, que deu sangue e suor para que eu pudesse estudar inglês, fazer basquete, natação ou judô. Ela quem nomeou o mundo e os sentimentos antes que eu pudesse sequer falar, quem me ensinou a ler e escrever, e quem sempre vem me ensinando as coisas da vida. Professora que há gerações muda pessoas para construir um mundo melhor. Agradeço a senhora por tudo feito por mim até hoje. Sou grato, também, a minha segunda mãe, a minha tia Sandra, que sempre esteve presente na minha vida, me educando e me dando amor. Que chegava muitas vezes cansada em casa, mas nunca recusou me contar uma história ou me pôr para dormir, além de ter despertado meu interesse pela leitura. Obrigado.

Agradeço ao meu pai Jorge, por nunca ter deixado me faltar nada.

Agradeço aos meus irmãos, Victor e Bia, que me ensinaram a viver em união e nunca deixaram de me amar e ajudar em minhas jornadas. Agradeço em especial meu irmão mais velho Victor por sempre ter sido mais que um irmão para mim assumindo, muitas vezes, papel de guia e responsável. Que me mostrou como esse mundo é bonito e me influenciou a estudá-lo. Estou me tornando biólogo por sua causa.

Sou grato por sempre ter sido cercado de pessoas incríveis que sempre me deram amor e apoio em diferentes momentos da minha vida e poder ainda os chamar de amigos. Agradeço a Sérgio e Leo por terem dividido os melhores e piores momentos da minha vida, dividindo cada vitória e cada derrota ao meu lado sempre. Agradeço aos que conquistei nos tempos de escola e fizeram esse período o mais prazeroso que poderia ser e que me acompanham até hoje Adele,

Brubs, Larissinha, André, Carol, Caio, Gabi, Maria, Milla, Guga e Ju. Obrigado. Também agradeço a Emerson, Caio Vinícios, Edvaldo, André Lapa por terem me dado apoio e fazer os dias mais alegres e mais leves. Agradeço aos meus irmãos da Rural que dividiram vários momentos importante nesses últimos quatro anos de convivência dentro e fora da universidade. Esses que passaram pelas mesmas coisas ao meu lado, que fizeram da graduação um período gostoso de ser lembrado e que estão para ficar. Agradeço a Matheus, Dani, Kayke, Victor, Andreza, Sybelle, Amanda, Letícia, Babi, Stef, Lucca e Feio pelo carinho, amor e apoio durante esses quatro anos e pelos que virão também.

Agradeço a João Lucas por ter feito esses últimos dois anos mais bonitos e coloridos ao seu lado e principalmente ter me dado muito apoio na construção desse TCC e nos passos seguintes a ele.

Agradeço a UFRPE por ter sido meu lar por esses quatro anos que se passaram, pelo melhor RU do Brasil e por todo conforto que uma universidade pode prover. Agradeço ao corpo docente da Rural pela formação, cuidado, atenção e carinho com que me formaram biólogo, vão ser sempre lembrados com carinho por mim. Agradeço especialmente ao professor Martín Alejandro por ser um professor incrível, além de ter despertado em mim um interesse especial pela genética e suas ferramentas. Obrigado também por ter aceitado ser meu orientador em meus dois estágios obrigatórios.

Agradeço ao Laboratório de Referência em Esquistossomose por permitirem minha participação no grupo, bem como sempre terem cuidado com minha formação científica. Agradeço especialmente a Rodrigo por ter me ensinado, com muita paciência, os procedimentos laboratoriais do laboratório, bem como sempre ter respondido minhas perguntas científicas. Agradeço ao professor Wheverton por suas falas e colocações nas apresentações do laboratório, além da revisão deste trabalho. E por fim, agradeço a minha orientadora, Dr. Elaine, pela orientação, paciência e cuidado que sempre teve comigo e meus textos.

I loved you completely, and you loved me the same. That's all. The rest is confetti.

**Aos meus avós Adalberto e Julhinha
(*in memoriam*).**

RESUMO

A esquistossomose é uma doença negligenciada causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. No mundo, cerca de 207 milhões de pessoas distribuídas por 78 países são acometidas pela infecção, cuja carga global da doença chega a 1,9 milhão de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs). Nas Américas, 1,8 milhão de pessoas são acometidas pelo *Schistosoma mansoni*, responsável pela manifestação hepatointestinal da doença. No Brasil, a prevalência nacional passou de 10% aos 0,99% por meio da implementação de políticas públicas de controle da doença, que visa diagnosticar e tratar os doentes. Nesse sentido, o Kato-Katz, capaz de determinar o *status* de infecção do paciente, bem como sua carga parasitária, desempenhou um papel vital no controle da doença. Entretanto, devido à mudança do perfil epidemiológico da doença, o método vem perdendo sua sensibilidade em áreas de baixa endemicidade, já que o mesmo é influenciado pela carga parasitária do paciente. Diante disso, novas estratégias de diagnóstico da doença vêm sendo estudadas para suprir a necessidade de um método diagnóstico mais sensível, viabilizando o controle da doença. Uma alternativa estudada é o diagnóstico molecular da doença, que se baseia na utilização da biologia molecular como ferramenta de diagnóstico. Portanto, o trabalho objetivou realizar uma revisão sistemática da literatura buscando trabalhos publicados nos últimos 20 anos que utilizassem a biologia molecular para diagnosticar populações humanas afetadas pela esquistossomose mansônica. Para tal, foram pesquisadas palavras referentes ao tema proposto nas bases de pesquisa Medline, Pubmed, Science Direct e Scielo com um filtro de 2000 a 2021. Dos artigos localizados, foram selecionados aqueles que utilizassem uma metodologia de diagnóstico molecular da esquistossomose associada ao Kato-Katz e que o aplicassem em uma população humana residente em área endêmica para a doença. Após seleção, 20 artigos foram incluídos na revisão. Dos 20 trabalhos que utilizavam métodos moleculares para o diagnóstico da esquistossomose associados a um método parasitológico, 12 utilizaram amostras de fezes, 8 amostras de urina e 4 amostras de soro. Desses trabalhos, quatro deles avaliaram mais de um tipo de amostra biológica. Os artigos que utilizaram amostras de fezes apresentaram

sensibilidade maior que 69% e especificidade maior que 29% para esse tipo de amostra, enquanto que a sensibilidade dos trabalhos que utilizaram urina, de forma geral, foram maiores que 88% com especificidades maiores que 82%. Os trabalhos que utilizaram amostras de soro apresentaram sensibilidades de 20% a 94,10%, com especificidade acima de 98%. Além de sensibilidade e especificidade, foram analisados valores de acurácia para a discussão dos métodos estudados. Dessa forma, o estudo destaca a potencialidade da utilização da biologia molecular como alternativa de diagnóstico da esquistossomose mansônica em diversas áreas com níveis de endemicidade diferentes.

Palavras-Chave: Esquistossomose mansônica, diagnóstico molecular, Kato-Katz.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. Worldwide, about 207 million people in 78 countries are affected by the infection, the global burden of the disease reaches 1.9 million disability-adjusted life years (DALYs). In the Americas alone, 1.8 million people are affected by *Schistosoma mansoni*, responsible for the hepatointestinal manifestation of the disease. In Brazil, the national prevalence rose from 10% to the current 0.99% through the implementation of public policies for disease control that aim to diagnose and treat patients. In this sense, Kato-Katz, capable of determining the patient's infection status, as well as their parasite load, played a vital role in controlling the disease. However, due to the change in the epidemiological profile of the disease, the method has been losing its sensitivity in areas of low endemicity, as it is influenced by the patient's parasite load. Therefore, new disease diagnosis strategies have been studied to meet the need for a sensitive diagnostic method, enabling proper disease control. An alternative studied is the molecular diagnosis of the disease, which is based on the use of molecular biology as a diagnostic tool. Therefore, the aim of this work was to carry out a systematic literature review looking for works published in the last 20 years that used molecular biology to diagnose human populations affected by schistosomiasis mansoni. To this end, words referring to the proposed topic were

searched for in the Medline Pubmed, Science Direct and Scielo databases with a filter from 2000 to 2021. Of the selected articles, those that used a molecular diagnosis associated with a parasitological method for schistosomiasis, and were applied to a human population residing in an endemic area for the disease were selected. After selection, 20 articles were included in the review. Of the 20 studies, 12 used stool samples, 8 urine samples and 4 serum samples. Of these works, four of them evaluated more than one type of biological sample. Articles that used stool samples showed sensitivity greater than 69% and specificity greater than 29% for this type of sample, while the sensitivity found in urine studies, in general, were greater than 88% with specificities greater than 82%. Studies that used serum samples showed sensitivities from 20% to 94.10%, with specificity above 98%. In addition to sensitivity and specificity, other accuracy values were analyzed to discuss the studied methods. The study shows the potential of using molecular biology as an alternative for diagnosing schistosomiasis mansoni in several areas with different levels of endemicity.

KeyWords: Schistosomiasis mansoni, molecular diagnose, Kato-Katz.

Sumário

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
A ESQUISTOSSOMOSE	12
EPIDEMIOLOGIA	15
DIAGNÓSTICO	15
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
RESULTADOS	19
Quadro 1	23
Quadro 2	24
Quadro 3	25
Referências incluídas na revisão	26
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	30
RREFERÊNCIAS	31

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecciosa categorizada pela Organização Mundial de Saúde como doença negligenciada. Estima-se que aproximadamente 207 milhões de pessoas distribuídas em 78 países sejam acometidas pela doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017, 2020). Nas Américas, cerca de 1,8 milhão de pessoas são acometidas pela esquistossomose intestinal, causada pelo *Schistosoma mansoni* (OPAS 2010) e, no Brasil, a prevalência varia de 0,1% a 73,1%, dependendo da localidade (CASAVECHIA et al., 2017).

No Brasil, a prevalência da esquistossomose foi avaliada em três grandes inquéritos populacionais que evidenciaram uma prevalência de 10% e 6,6% nos anos de 1950 e 1977, respectivamente (NOYA et al., 2015; PELLON; TEIXEIRA, 1950). E, no último inquérito realizado entre os anos 2010 - 2014, a prevalência da doença foi estimada em 0,99% (KATZ, 2018). Foi a partir da realidade de alta prevalência nacional, entre os períodos de 1950 e 1977, que Katz e colaboradores desenvolveram uma metodologia de diagnóstico para a esquistossomose mansônica capaz não só de identificar um indivíduo infectado, mas também determinar sua carga parasitária, o método “Kato-Katz” (KATZ; CHAVES; PELEGRINO, 1972).

Este método é utilizado em todo o mundo, caracterizado pela sua alta especificidade, sendo designado como diagnóstico padrão ouro. Entretanto, sua sensibilidade depende da carga parasitária do hospedeiro, decaindo em pacientes com baixas cargas parasitárias. Diante disso, novas alternativas diagnósticas, como o desenvolvimento de imunodiagnósticos e testes moleculares vêm sendo estudadas e desenvolvidas (WEERAKOON et al., 2015). As metodologias que envolvem a detecção de anticorpos no soro dos pacientes são eficientes, porém, sua sensibilidade ainda é menor do que aquelas capazes de detectar a presença do material genético do parasita em amostras biológicas dos pacientes (FUSS; MAZIGO; MULLER, 2020). Além disso, ensaios imunológicos para o diagnóstico da esquistossomose

demonstraram uma baixa especificidade, evidenciada pelo elevado número de diagnósticos falso-positivos que ocorrem por reação cruzada (LIN et al., 2008; XU et al., 2011), juntamente com a não possibilidade para detecção da infecção ativa, podendo o resultado ser uma resposta imune do hospedeiro a infecções já debeladas (ZHOU et al., 2011).

As metodologias envolvendo biologia molecular vêm sendo cada vez mais estudadas, tendo em vista sua alta sensibilidade (CAVALCANTI et al., 2019). Um exemplo de técnica molecular que vem sendo empregada é a Reação de Cadeia Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) (PCR) (PONTES et al., 2002), e o *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), que é eficiente no diagnóstico de doenças negligenciadas, não somente por sua alta sensibilidade, mas também por ser um método simples e que necessita de apenas de alguns reagentes e um termobloco (ABBASI et al., 2010, NOTOMI et al., 2000).

Diversos trabalhos foram realizados, visando validar e desenvolver diagnósticos moleculares para a esquistossomose. A tecnologia LAMP, por exemplo, que consiste na amplificação de DNA empregando de quatro a seis *primers* em condições isotérmicas (NOTOMI et al., 2000), foi empregada para o diagnóstico em humanos e vetores, obtendo maior acurácia quando comparados com uma reação de Nested-PCR e Kato-Katz (GANDASEGUI et al., 2018). Outras técnicas derivadas da tradicional PCR foram adaptadas para o diagnóstico desta helmintíase, como a Nested-PCR e a *Real Time PCR*. A Nested-PCR é caracterizada pela amplificação de um segmento amplo de DNA e a utilização, em seguida, do produto dessa reação para uma segunda amplificação. Enquanto que a *Real Time PCR* é uma reação de PCR que não necessita da eletroforese para interpretar os resultados. Assim, essas técnicas foram utilizadas para diagnosticar tanto a mielopatia esquistossomótica (BRUSKY et al., 2016), quanto formas convencionais ou clássicas da doença (MAGALHÃES et al., 2020).

Diante disso, este trabalho objetivou revisar e buscar na literatura os principais métodos de diagnóstico molecular utilizados para diagnosticar a esquistossomose mansônica em amostras biológicas humanas:-

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ESQUISTOSSOMOSE

Biologia

A esquistossomose é uma doença provocada por parasitas do gênero *Schistosoma*, incluído no filo *Platyhelminthes*, Classe Trematoda, Ordem Strigeiforme, Superfamília Schistosomatoidea e Família Schistosomatidae (SILVA et al., 2008). O gênero comporta seis espécies capazes de infectar o homem, sendo elas: *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. mansoni*, que podem ser encontrados em diferentes regiões do mundo, apresentando fisiopatologias diferentes, a depender da espécie. Os vermes de *S. mansoni* são caracterizados por dimorfismo sexual em sua fase adulta. Assim, no macho pode ser observado a presença de duas ventosas na porção anterior de seu corpo, sendo uma oral e uma terminal, denominada acetábulo. A fêmea tem o corpo mais longo e mais delgado que o macho, também apresentando um par de ventosas. Ao atingir sua forma adulta, a fêmea pode ser encontrada no canal ginecóforo do macho (REYS, 2007).

O ciclo de vida do parasito envolve seis fases de desenvolvimento. O ovo, com formato ovóide e espícula lateral (*S. mansoni*), revestido por esclerotina e de cor amarelada, é posto pela fêmea no interior das veias mesentéricas inferiores, onde passa pela parede do intestino até atingir seu lúmen. Na luz intestinal, o ovo é excretado junto às fezes ao final do processo de digestão. No ambiente externo, os ovos têm vida útil de 2 a 5 dias junto às fezes, cuja expectativa de vida pode ser diminuída a depender da umidade a qual o ovo esteja submetido. A eclosão do ovo depende não só da presença de água, mas também da luz e temperatura, ocorrendo em períodos ensolarados e quentes. Se excretado em corpo d'água, o miracídio, forma evolutiva ciliada responsável pela infecção dos vetores gastrópodes, localiza por quimiotaxia o vetor e, quando o encontra, utilizara as glândulas de penetração presentes na região anterior do miracídio para penetrar ativamente no gastrópode, dando início ao processo de infecção do vetor. O miracídio tem uma vida útil

curta, sobrevivendo na água aproximadamente 8-12h, sendo as duas primeiras horas, após a eclosão do ovo, as de maior sucesso para infecção. Ao penetrar o molusco, o miracídio perde seu epitélio ciliado e se fixa na região que penetrou. Após a sua maturação, o mesmo se transforma em esporocisto primário, que é dotado de inúmeras células germinativas e inicia seu processo de multiplicação, dando origem a esporocistos filhos. Esses esporocistos secundários migram para o hepatopâncreas e ovoístis do caramujo e iniciam outro processo de maturação, o qual finaliza de três a quatro semanas, com a liberação da próxima fase evolutiva, as cercárias. Os esporocistos podem continuar a infectar o vetor por diversas gerações, e entre elas, ainda liberar cercárias. As cercárias, forma evolutiva responsável pela infecção de mamíferos, possuem complexa organização corporal, com um corpo alongado e cilíndrico, com uma cauda bifurcada utilizada em sua locomoção. A temperatura e luminosidade influenciam na capacidade de infecção e na localização do hospedeiro definitivo, sendo a maior densidade de cercárias na água encontrada às 11h, com declínio total das mesmas entre as 16-17h. Ao encontrar o hospedeiro vertebrado, a cercária libera um conjunto de substâncias proteolíticas presentes em suas glândulas e perde sua cauda, introduzindo apenas a parte apical de seu corpo. Posterior a entrada do verme no hospedeiro vertebrado, assume a forma de esquistossômulo e ganha a corrente sanguínea em direção ao coração e pulmões de forma passiva. Ao chegar nos vasos do pulmão, modificam um pouco sua estrutura, se tornando maiores, e após o 8º dia da infecção, o verme já pode ser encontrado no sistema porta intra-hepático e lá assumem a forma de vermes adultos macho e fêmea, copulam e as fêmeas começam a ovopositar, dando continuidade ao ciclo (REY, 2018; SILVA et al., 2008; MCMANUS et al., 2018; BARBOSA; GOMES, 2017).

Como mencionado anteriormente, o parasito necessita de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida, um mamífero e o outro gastrópode. No caso da transmissão das espécies de *Schistosoma*, o molusco vetor onde o parasito se reproduz de forma assexuada pertence aos gêneros *Biomphalaria* e *Bulinus*, da família Planorbidae, *Oncomelania*, *Neotriculae* e *Robertsiella*, que é da família Pomatiopsidae. Ademais, é estudada a possibilidade de a

transmissão ser mediada por espécies híbridas de moluscos (ABOU-EL-NAGA et al., 2011). Entretanto, devido ao extenso processo de coevolução entre parasita-vetor, algumas espécies de *Schistosoma* têm seu ciclo de vida completo apenas através da infecção por vetores específicos. Um exemplo é a relação entre *S. mansoni* e *Biomphalaria pfeifferi*; *S. haematobium* e *Bulinus africanus* e *S. japonicum* e *Oncomelania hupensis* (SONOGO et al., 2018, ABOU-EL-NAGA et al., 2011). No Brasil, as principais espécies responsáveis pela manutenção da transmissão da doença são *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, gastrópodes pulmonados, hermafroditas aquáticos que habitam coleções de água doce. No país, estão distribuídos em 24 estados, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2019).

Doença

A progressão da infecção pode resultar em diferentes manifestações clínicas, essas podem ser classificadas como fase aguda, que caracteriza o primeiro contato do parasita com o hospedeiro, sendo sintomático ou não, e fase crônica, quando a infecção já está estabelecida e as fêmeas adultas liberam ovos. Os sintomas apresentados na fase aguda são conhecidos como Febre de Katayama. Nessa fase, o indivíduo apresenta uma resposta imunológica exacerbada aos antígenos liberados durante a migração do esquistossômulo, que pode ocorrer entre duas e três semanas após a exposição ao parasito. Os sintomas são inespecíficos, como febre, dermatite (nesse caso chamada de dermatite cercariana), cefaléia e náusea (ROSS et al., 2007). No caso da fase crônica, os sintomas são mais graves e ocorrem a partir de seis meses após a infecção. Nessa fase, sintomas hepáticos, hepatoesplênicos (compensados ou não) e intestinais podem ocorrer a depender de fatores como: competência imune do hospedeiro, cepa do parasito, idade, sexo e região geográfica. Vale ressaltar que toda a sintomatologia da esquistossomose depende diretamente da resposta imune do hospedeiro, a partir da reação granulomatosa estabelecida contra os ovos do parasita (NEVES et al., 2016, BRASIL, 2019)

EPIDEMIOLOGIA

Disseminada por 78 países, a esquistossomose é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doença tropical negligenciada (OMS, 2021). Estima-se 779 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção, enquanto 250 milhões estão sob infecção ativa por *Schistosoma spp.* (STEINMANN et al., 2006). A carga global estimada da doença é de 1,9 milhão de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs), enquanto que estimativas anteriores eram de 1,7 a 4,5 milhões de DALYs (VEERMAN, 2017).

Das 18.421.113 mortes listadas no Brasil entre os anos de 2003 a 2018, a esquistossomose foi mencionada em 0,06% dos casos, desses, 70,87% a doença foi considerada como causa subjacente do óbito e, em 29,13%, foi a causa associada a morte (PINHEIRO et al., 2020). Apenas no estado de Pernambuco, 2.578 casos de óbito ocorreram e entre 1993 e 2014, 473 hospitalizações foram registradas, o que indica um grande número de mortes e hospitalizações pela doença em relação a outros estados do país (BARBOSA et., 2016).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da infecção por *S. mansoni* pode ser realizado por diversas técnicas, sendo a microscopia direta de fezes pelo método Kato-Katz, descrito na década de 70, o método padrão-ouro utilizado mundialmente (BRASIL, 2019). A técnica desenvolvida por Katz e colaboradores em 1972 (KATZ et al., 1972) é um método quantitativo utilizado para determinar a infecção pelo agente etiológico da esquistossomose e determinar a carga parasitária na infecção. Ocorre em três simples passos: a passagem das fezes frescas ou conservadas por uma malha, a adição das fezes peneiradas sob uma lâmina microscópica com o auxílio de uma placa com orifício de 6 mm de diâmetro e, por fim, a cobertura da lâmina com lamínula de celofane impregnada com verde malaquita (BARBOSA et al., 2017).

Embora a técnica seja de execução simples e barata, a sensibilidade do Kato-Katz depende diretamente da carga parasitária do infectado, sendo menor para casos de infecção leve (BÄREMBOLD et al., 2017). Diante da mudança de cenário epidemiológico, decorrente da implementação de medidas de

controle da esquistossomose, tem se observado a mudança do perfil epidemiológico em localidades anteriormente classificadas como altamente endêmicas, passando a serem consideradas áreas de baixa endemicidade (SILVA et al., 2020, SANTOS et al., 2020), o que diminui a sensibilidade do método padrão ouro utilizado.

Nesse sentido, novas alternativas de diagnóstico da doença vêm sendo estudadas, dentre elas metodologias modernas envolvendo detecção de antígenos do verme, anticorpos específicos contra o verme e a detecção de DNA do verme em diversas amostras biológicas (MACMANUS et al., 2018). Ao se alimentar, o verme adulto libera como excreta duas substâncias passíveis de detecção, o Antígeno Catódico Circulante (CCA) e o Antígeno Anódico Circulante (CAA), que podem ser identificadas por métodos imunológicos. O método mais utilizado para detectar tais substâncias é o POC-CCA. Alternativa *Point of Care* (POC) aplicada principalmente em áreas endêmicas para triagem e administração do tratamento em massa. Além disso, técnicas como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e testes de imunocromatografia lateral já foram descritas (DAM et al., 2013, BEZERRA et al., 2018). Entretanto, essas metodologias têm sua eficácia limitada em localidades de baixa endemicidade, pois a quantidade de antígenos depende da intensidade da infecção, sendo assim, em localidades onde os infectados têm baixa carga parasitária ou em caso de pessoas que vivem em áreas não endêmicas e viajam para áreas endêmicas, esses métodos podem apresentar baixa sensibilidade (LIESHOUT et al., 1995).

Diante disso, os métodos moleculares são estratégias que estão em estudo para o diagnóstico da esquistossomose em áreas de baixa endemicidade ou em viajantes (MACMANUS et al., 2018). Uma das técnicas moleculares empregadas é a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que foi descrita por Mullis e colaboradores em 1986. A PCR permite a amplificação de trechos específicos de DNA por intermédio de uma enzima DNA-polimerase, podendo ser aplicada para diversos fins dentro das biociências. A reação de amplificação se inicia com o anelamento de um par de oligonucleotídeos sintéticos de fita simples nas extremidades da porção do DNA a ser amplificado. Para que isso ocorra, a desnaturação da fita dupla de DNA é realizada pelo aumento da temperatura. Após o anelamento dos

oligonucleotídeos, a DNA-polimerase, junto a desoxinucleotídeos livres na reação, iniciam a amplificação da região do material genético alvo. Esse ciclo só é possível pela oscilação da temperatura, presença de substratos necessários e condições para que a reação ocorra (WATSON et al., 2015). Ademais, existem variações da PCR convencional que podem ser utilizadas também para o diagnóstico.

A PCR pode ser utilizada como forma de diagnóstico da esquistossomose e outras infecções, quando o alvo da amplificação, ou seja, o material genético que será amplificado, é encontrado no material biológico do paciente (ROSTAMI et al., 2020). No caso da esquistossomose, diversos protocolos já foram estudados para diversos tipos de amostra biológica (FERRER et al., 2020).

Outra forma de diagnóstico molecular aplicada na detecção e controle da esquistossomose é o LAMP. Técnica descrita no ano 2000 por Notomi e colaboradores que é capaz de amplificar vários trechos específicos de DNA ao mesmo tempo. A técnica utiliza 4 *primers* e consiste na amplificação de fragmentos de DNA já amplificados por outros *primers*, resultando em diversos produtos em *loop* que são detectados por diversos métodos.

Diante do exposto, fica evidente os avanços relacionados ao desenvolvimento de métodos diagnósticos alternativos para solucionar os problemas e deficiências do método Kato-Katz, dentre elas, os métodos que aplicam técnicas de biologia molecular vêm se destacando. No entanto, não é fácil encontrar o método ideal ou mais adequado para uso, a depender da amostra biológica ou do tipo de abordagem epidemiológica utilizada para execução dos inquéritos parasitológicos. Considerando esses aspectos e a problemática, este trabalho visa, por meio de uma revisão sistemática, identificar os melhores métodos moleculares para o diagnóstico da esquistossomose.

OBJETIVOS

1.1 Geral: Identificar os melhores métodos de diagnóstico molecular para esquistossomose mansônica aplicados às populações humanas.

1.2 Específicos:

- Comparar as diferentes metodologias de diagnóstico molecular utilizadas no diagnóstico da esquistossomose mansônica;
- Avaliar as diferentes amostras biológicas utilizadas no diagnóstico molecular da esquistossomose mansônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

A base metodológica para realização deste trabalho foi a revisão integrativa: a pesquisa baseada em evidências. Para tanto, foi escolhido o tema diagnóstico molecular para a esquistossomose mansônica.

Após a escolha do tema, foram selecionadas as seguintes palavras-chave, com base nos testes moleculares mais utilizados para identificar infecção por *Shistosoma mansoni*: 'LAMP and *Shistosoma mansoni*', 'PCR and *Shistosoma mansoni*', 'Nested PCR and *Shistosoma mansoni*', 'Real time PCR and *Shistosoma mansoni*', 'RLFP PCR and *Shistosoma mansoni*', 'Loop-mediated isothermal amplification and *Shistosoma mansoni*', 'Polymerase chain-reaction and *Shistosoma mansoni*' e qPCR and *Schistosoma mansoni*, Reação em cadeia da polimerase and *Schistosoma mansoni*. Estas foram utilizadas para pesquisar a bibliografia nas bases de dados bibliográficos Medline, Pubmed, Science Direct e Scielo.

Na busca, foi aplicado o filtro do ano 2000 a 2021, para que aparecessem apenas artigos publicados desde a descrição do LAMP. Apenas artigos em português e inglês foram analisados. Dos artigos que apareceram na busca, foram selecionados os que tinham o nome da técnica molecular e *Schistosoma mansoni* ou Schistosomiasis nos títulos ou resumos, sendo organizados em uma planilha do programa *Microsoft Excel*.

Os 120 artigos que atenderam ao critério de busca nas bases de dados passaram por uma leitura dos resumos pelos autores e foram classificados em Otimização da técnica (O), para os artigos que realizaram a parte experimental do teste ou Validação do teste (V), para os estudos que já haviam passado pela parte experimental e estavam sendo testados em uma população. Artigos que realizaram a otimização da técnica e a validaram foram classificados como 'O e V'. E 'não se aplica' foi utilizado para classificar

os artigos que não respeitaram os critérios acima. Além disso, apenas os artigos que apresentavam um método parasitológico para o diagnóstico foram selecionados. Após esta etapa, foram excluídos os artigos repetidos e selecionados apenas os classificados como V, totalizando 51 artigos.

Os 51 selecionados foram lidos por completo e foram extraídos os seguintes dados para posterior discussão: Tamanho da população, Tipo de amostra, Endemicidade da área de estudo, Prevalência baseada em dados epidemiológicos obtidos a partir da técnica Kato-Katz 'padrão ouro', Prevalência baseada no teste molecular avaliado, Sensibilidade, Especificidade e um pequeno resumo do artigo com algumas palavras-chave. Após isso, foram excluídos os artigos que não utilizaram as técnicas de biologia molecular para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em hospedeiros humanos, artigos que não apresentaram resultados de sensibilidade e especificidade e artigos que se tratavam de estudo de caso, resultando em 20 artigos restantes.

RESULTADOS

Dos 20 trabalhos que utilizaram métodos moleculares para o diagnóstico da esquistossomose associados a um método parasitológico, 12 utilizaram amostras de fezes, 8 amostras de urina e 4 amostras de soro. Desses trabalhos, quatro deles avaliaram mais de um tipo de amostra biológica.

Os artigos que utilizaram amostras de fezes em seus ensaios moleculares apresentaram sensibilidade acima de 69% e especificidade maior que 29%. Um trabalho (Referência 15) não apresentou dado de sensibilidade nem especificidade e dois artigos (Referência 4, 8) não apresentaram dados de especificidade. Para esse tipo de amostra, foram avaliadas as técnicas de qPCR ou Real Time-PCR, PCR convencional, PCR-ELISA e LAMP. Sete artigos apresentaram a sensibilidade calculada para o método ouro, esse sempre sendo um método parasitológico associado ou não a outro método diagnóstico, podendo estar compilado ou apresentado separado dos outros métodos utilizados. A sensibilidade dos métodos parasitológicos foi menor do que a dos métodos moleculares avaliados na maioria dos trabalhos, apenas

no estudo 7, a sensibilidade do POC-CCA, tendo o Kato-Katz como método ouro, foi maior do que o método molecular em uma análise de classe latente. Nove trabalhos (Referência 1,2,3,7,12,14,17,18,19) apresentaram a especificidade calculada para os métodos moleculares e cinco (Referências 1,2,7,14,17) para os métodos parasitológicos.

A maior sensibilidade encontrada para amostras de fezes foi de 98,70%, obtida pelos trabalhos 7 e 14 em um ensaio de qPCR e PCR convencional, respectivamente. A especificidade dos mesmos testes foram de 81,20 e 100%, respectivamente. O trabalho 7 calculou os valores de sensibilidade e especificidade tanto usando o KK como método ouro, quanto utilizando análise de classe latente, os resultados mencionados são referentes a essa análise. A maior especificidade foi de 100% e foi obtida pelo trabalho 7, além do trabalho 14, em um ensaio de PCR convencional. O trabalho 14 foi mais sensível e mais específico dentre os trabalhos que utilizaram amostra de fezes para o diagnóstico da esquistossomose. Os trabalhos que obtiveram maior sensibilidade e especificidade para as reações de qPCR, PCR-ELISA e LAMP foram os trabalhos 1 (sensibilidade: 95,30%; especificidade: 94,30%), 18 (sensibilidade: 97,40% especificidade: 91,10%) e 19 (sensibilidade: 92,86%; especificidade: 80,11%), respectivamente.

Nove trabalhos (Referências 1,2,3,7,12,14,17,18,19) apresentaram a prevalência calculada com base no método molecular e no método parasitológico. As razões de prevalência variaram entre 0,16 (Referência 17) e 9,94 (Referência 19). Quase todos os trabalhos que apresentaram esse dado obtiveram uma prevalência maior pelo diagnóstico molecular do que pelo método padrão ouro, resultando numa razão entre as prevalências maior que 1. Entretanto, dois artigos obtiveram uma prevalência maior pelo padrão ouro do que pelo diagnóstico molecular (Referências 7,17) obtendo a razão entre as prevalências menor que 1.

Dos trabalhos que analisaram amostras de fezes, seis deles calcularam os valores preditivos positivos e negativos (VPP e VPN) (Referências 1,3,12,14,17,19), e o artigo 2 apresentou apenas o valor preditivo positivo, para os testes moleculares. O maior VPP apresentado foi de 100%

apresentado pelos artigos 14 e 17, enquanto o maior VPN foi de 99,33% (Referência 19). Os maiores VPP e VPN presentes em um mesmo trabalho foram de 100% e 99,30%, respectivamente, encontrados no trabalho 14.

A sensibilidade dos métodos moleculares que utilizaram urina para o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* foi, de forma geral, maior que 88%, enquanto a especificidade foi maior que 82%. Entretanto, os trabalhos 5 e 17 obtiveram valores de sensibilidade bem menores quando comparados com as demais pesquisas (33,30% e 8,70% respectivamente). O único trabalho com especificidade menor que 82% foi o 20, para a reação de LAMP que utilizou o kit de extração *LAMP-PURE* com especificidade de 14%. Os ensaios moleculares utilizando esse tipo de amostra foram: qPCR ou Real Time- PCR, PCR convencional e LAMP. Todos os trabalhos apresentaram tanto a sensibilidade quanto a especificidade do teste molecular, entretanto o trabalho 5 não calculou a especificidade, a considerou 100% para suas análises. A sensibilidade do método parasitológico foi sempre maior que 44%, com exceção do trabalho 13, em que seu valor foi de 11% para o Kato-Katz.

A maior sensibilidade obtida pelos testes moleculares foi de 100%, obtida pelos trabalhos 10, 11, 13, 16 e 20. Nesses mesmos artigos, as especificidades foram de 100%, 82,60%, 100%, 91,20% e 100%, respectivamente. As maiores especificidades foram dos trabalhos 9 e 17, sendo 100% para os dois, incluindo os trabalhos 10, 11 e 20 já citados. Os melhores valores de sensibilidade e especificidade foram apresentados nos trabalhos 10 e 13, utilizando a PCR convencional como plataforma de diagnóstico. O trabalho que utilizou a técnica de LAMP obteve valores de sensibilidade que chegaram a 100%, dependendo do método de extração de DNA utilizado, enquanto o trabalho que utilizou a qPCR apresentou sensibilidade de 33,30%.

Cinco artigos (Referências 5, 9, 10, 13, 17) dados de sensibilidade para o método parasitológico utilizado, a maior foi obtida pelo trabalho 17, sendo 47,83%. Quatro artigos (Referências 9, 10, 13, 17) apresentaram a especificidade adquirida pelo método ouro, e esta foi sempre de 100% para

o Kato-Katz. Seis trabalhos apresentaram os valores de prevalência para ambas as formas de diagnóstico, o molecular e o parasitológico, e os trabalhos 9, 10, 13 e 16 obtiveram uma prevalência maior pelo método molecular do que pelo método parasitológico e/ou sorológico, com uma razão entre as prevalências maior que 1, podendo chegar a 9,75. Os trabalhos 5 e 17 obtiveram uma prevalência maior pelos métodos parasitológicos e imunológicos do que pelos métodos moleculares, com valores de 0,36 e 0,89 vezes menores que os obtidos pelo método molecular. Os VPP e VPN foram apresentados em 6 trabalhos, o trabalho 5 apresentou apenas o VPN. Os maiores VPPs foram observados nos artigos 9,10,13,17 e 20 com valor de 100%. Os maiores VPNs foram encontrados nos trabalhos 10,13,16 e 20, sendo também de 100%. Os estudos que obtiveram os maiores VPPs e VPNs (100%) para os testes moleculares em amostras de urina foram apresentados pelos trabalhos 10 e 13.

Para amostras de soro, as sensibilidades foram de 20%, 33,30%, 94,10% (Referências 3, 5, 6, respectivamente). Enquanto os valores de especificidade se encontram acima de 98%, sendo a do artigo 5 assumida como 100%, não calculada. O trabalho 17 não apresentou amplificação para PCR de soro em seu trabalho. As técnicas moleculares utilizadas para esse tipo de amostra foram a qPCR ou Real Time-PCR e a PCR convencional.

O trabalho que apresentou maior sensibilidade e especificidade para amostras de soro foi o trabalho 6, que, com uma qPCR, obteve sensibilidade de 94,10%, em pacientes com microscopia positiva, e especificidade de 98,90%. O trabalho que utilizou PCR convencional não obteve amplificação do DNA de *S. mansoni* em seus ensaios. A sensibilidade dos métodos parasitológicos foi acima de 49%. A especificidade do trabalho 17, único a calculá-la, foi de 100%. Dois trabalhos que calcularam a prevalência por ambos os métodos, obtiveram uma prevalência maior pelo método molecular do que pelo método parasitológico utilizado, com uma razão entre as prevalências maior que 1. O artigo 3 apresenta os valores de PPV e VPN, sendo esses 12,5% e 99,30%, respectivamente. O trabalho 5 trouxe apenas o valor de VPN para seu diagnóstico e esse foi de 88,90%.

17	PCR	69,57%	47,83%	100%	100%	17,10%	21,60%	1,2x	VPP=100 % VPN= 84,54%
18	PCR- ELISA	97,40%	-	91,1% ou 85,1%	-	18%	25,2% ou 30,10%	1,4x ou 1,67x	-
19	SmMIT- LAMP	92,86%	-	80,11%	-	3,04%	30,24%	9,94x	VPP= 26% VPN= 99,33%

*Depende da quantidade de lâminas utilizadas no KK

**Com análise de classe latente ou não

Quadro 2: Trabalhos que utilizaram amostras de Urina

ID	Teste Molecular	Sensibilidade (Molecular)	Sesibilidade (parasitológico)	Especificidade (Molecular)	Especificidade (Ouro)	Prev. Padrão ouro	Prev. molecular	Razão (Prevalência)	VPP/VPN
5	Real Time PCR	33,30%	44,40%	100%	100%	34,33%	30,60%	0,89x	VPP= - VPN= 28%
9	PCR	99%	66%	100%	100%	66%	86%	1,30x	VPP= 100% VPN=92 %
10	PCR	100%	57%	100%	100%	51%	89%	1,74x	VPP=100 % VPN=100 %
11	PCR	100%	-	82,60%	-	-	46,60%	-	-

20	LAMP, PCR	17	16	13
PCR: 83% ou 79%	PCR	PCR	PCR	PCR
LAMP: -	8,70%	47,83%	-	100%
PCR: 100% ou 31%	100%	100%	91,20%	100%
LAMP: -	100%	100%	-	100%
-	17,10%	35,57%	8%	
PCR: 94% ou 88%	6,20%	41,24%	78%	
LAMP: 94% ou	0,36x	1,15x	9,75x	
-	VPP= 100% VPN=68, 18%	VPP= 86,25% VPN= 100%	VPP=100 % VPN=100 %	
PCR: PPV= 100% ou 90%				
VPN=				

Quadro 3: Trabalhos que utilizaram amostras de Soro

ID	Teste Molecular	Sensibilidade (Molecular)	Sesibilidade (parasitológico)	Especificidade (Molecular)	Especificidade (Ouro)	Prev. Padrão ouro	Prev. molecular	Razão (Prevalência)	VPP/VPN
3	qPCR-feces	20%	-	98,80%	-	0,90%	1,40%	1,55x	VPP=12,5 % VPN= 99,30%
5	Real Time PCR	96,30%	44,40%	100%	100%	34,33%	75%	2,18x	VPP= - VPN= 88,90%
6	PCR em tempo real	72,70% a 94,10%	49%	98,90%	-	-	-	-	-
17	PCR	% 0	47,83%	0%	100%	17,10%	-	-	-

Referências incluídas na revisão.

ID	Local	Ano	Referência
1	Madagascar	2014	SCHWARZ, Norbert G. et al. Schistosoma mansoni in schoolchildren in a Madagascar highland school assessed by PCR and sedimentation microscopy and Bayesian estimation of sensitivities and specificities. Acta tropica , v. 134, p. 89-94, 2014.
2	Brasil	2020	DO CARMO MAGALHÃES, Fernanda et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction to detect Schistosoma mansoni–infected individuals from an endemic area with low parasite loads. Parasitology , v. 147, n. 10, p. 1140-1148, 2020.
3	Brasil	2014	ESPÍRITO-SANTO, Maria Cristina Carvalho et al. Evaluation of real-time PCR assay to detect Schistosoma mansoni infections in a low endemic setting. BMC Infectious Diseases , v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.
4	Moçambique	2017	MEURS, Lynn et al. Diagnosing polyparasitism in a high-prevalence setting in Beira, Mozambique: detection of intestinal parasites in fecal samples by microscopy and real-time PCR. PLoS neglected tropical diseases , v. 11, n. 1, p. e0005310, 2017.
5	Tanzânia	2020	FUSS, Antje; MAZIGO, Humphrey Deogratias; MUELLER, Andreas. Evaluation of serum-based real-time PCR to detect Schistosoma mansoni infection before and after treatment. Infectious diseases of poverty , v. 9, n. 1, p. 1-7, 2020.
6	França	2019	GUEGAN, Hélène et al. Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis. PLoS neglected tropical diseases , v. 13, n. 9, p. e0007711, 2019.
7	Tanzânia	2018	FUSS, Antje et al. Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect Schistosoma mansoni infections in school children in Mwanza region, Tanzania. PloS one , v. 13, n. 8, p. e0202499, 2018.
8	Etiópia	2015	SCHUNK, Mirjam et al. Use of occult blood detection cards for real-time PCR-based diagnosis of Schistosoma mansoni infection. PLoS One , v. 10, n. 9, p. e0137730, 2015.
9	Gana	2014	LODH, Nilanjan et al. Detection of parasite-specific DNA in urine sediment obtained by filtration differentiates between single and mixed infections of Schistosoma mansoni and S. haematobium from endemic areas in Ghana. PLoS One , v. 9, n. 3, p. e91144, 2014.
10	Zambia	2013	LODH, Nilanjan et al. Diagnosis of Schistosoma mansoni without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect Schistosoma mansoni infection from filtered urine in Zambia. The American journal of tropical medicine and hygiene , v. 89, n. 1, p. 46, 2013.
11	Gana	2020	ANYAN, William K. et al. Assessment of dual schistosome infection prevalence from urine in an endemic community of Ghana by molecular diagnostic approach. Parasite epidemiology and control , v. 9, p. e00130, 2020.
12	Brazil	2003	PONTES, Luis A. et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with Schistosoma mansoni. The American journal of tropical medicine and hygiene , v. 68, n. 6, p. 652-656, 2003.
13	Zambia	2017	HESSLER, Megan J. et al. Detection of duo-schistosome infection from filtered urine samples from school children in Zambia after MDA. PLoS One , v. 12, n. 12, p. e0189400, 2017.

14	Brasil	2012	CARVALHO, Gabriel Costa de et al. Polymerase chain reaction for the evaluation of <i>Schistosoma mansoni</i> infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz , v. 107, p. 899-902, 2012.
15	Brasil	2013	CARNEIRO, Teiliane Rodrigues et al. A conventional polymerase chain reaction-based method for the diagnosis of human schistosomiasis in stool samples from individuals in a low-endemicity area. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz , v. 108, p. 1037-1044, 2013.
16	Brasil	2012	ENK, Martin Johannes; OLIVEIRA E SILVA, Guilherme; RODRIGUES, Nilton Barnabé. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of <i>Schistosoma mansoni</i> DNA in human urine samples from an endemic area. PloS one , v. 7, n. 6, p. e38947, 2012.
17	Venezuela	2020	FERRER, Elizabeth et al. Diagnostic performance of parasitological, immunological and molecular tests for the diagnosis of <i>Schistosoma mansoni</i> infection in a community of low transmission in Venezuela. Acta tropica , v. 204, p. 105360, 2020.
18	Brasil	2018	SENRA, Carolina et al. Development of a laboratorial platform for diagnosis of schistosomiasis mansoni by PCR-ELISA. BMC research notes , v. 11, n. 1, p. 1-5, 2018.
19	Brasil	2018	GANDASEGUI, Javier et al. A field survey using LAMP assay for detection of <i>Schistosoma mansoni</i> in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. PLoS neglected tropical diseases , v. 12, n. 3, p. e0006314, 2018.
20	Zambia	2019	PRICE, Miriam et al. Testing the infection prevalence of <i>Schistosoma mansoni</i> after mass drug administration by comparing sensitivity and specificity of species-specific repeat fragment amplification by PCR and loop-mediated isothermal amplification. The American journal of tropical medicine and hygiene , v. 101, n. 1, p. 78, 2019.

DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença negligenciada de importância mundial, em que as principais estratégias de controle se baseiam no diagnóstico de indivíduos doentes e tratamento dos mesmos. Para tal feito, diversas técnicas de diagnóstico foram e são desenvolvidas para esse propósito, entretanto, nem sempre possuem a acurácia necessária para tal finalidade. Diante disto, o objetivo desta integrativa foi avaliar os métodos de diagnóstico molecular empregados para a detecção de infecções por *S. mansoni* em amostras humanas, publicados nos últimos 20 anos, comparando o tipo de amostra biológica utilizada e método utilizado com o diagnóstico parasitológico em cada estudo.

Dos trabalhos que utilizaram amostras de fezes, os que obtiveram maior sensibilidade foram os trabalhos 7 e 14. O primeiro realizou um estudo

transversal em uma população (n=297) em idade escolar (7-16 anos) em dois distritos da Tanzânia e teve como objetivo comparar a eficiência do POC-CCA e da microscopia com uma reação de qPCR. Embora o método molecular tenha apresentado alta sensibilidade (96,84%), quando comparado com o KK, a especificidade do mesmo (29,55%) foi a menor dentre os trabalhos que utilizaram a qPCR e a menor dentre todos os trabalhos que utilizaram amostras de fezes. No entanto, empregando uma Análise de Classe Latente a sensibilidade e especificidade do método molecular aumentaram consideravelmente (98,7% e 81,2%, respectivamente). Isso pode ter ocorrido pela baixa sensibilidade do KK, que já foi relatada na literatura reduzindo a especificidade do método molecular testado (FUSS et al., 2018; MEURS et al., 2017). Já o trabalho 14, apresentou como objetivo avaliar a ocorrência da infecção por *S. mansoni* em uma área de baixa endemicidade em Minas Gerais, Brasil, por meio de uma PCR convencional (n=219). Neste trabalho, a sensibilidade da PCR foi consideravelmente maior quando comparada com duas lâminas de KK (98,7% e 20,80%, respectivamente). Além dos maiores valores de especificidade e sensibilidade, em relação ao KK, o trabalho 14 apresentou elevados valores preditivos (VPP= 100% e VPN= 99,30%, respectivamente), o que atribui credibilidade ao teste (MONAGHAN et al., 2021; ALTMAN, BLOND, 1994). Todos os trabalhos que avaliaram amostras de fezes utilizando LAMP, qPCR, PCR-ELISA e PCR convencional resultaram em uma prevalência maior pelo método molecular do que pelo método parasitológico, o que pode ser observado pela razão entre as prevalências, valores preditivos, sensibilidade e especificidade dos testes discutidos neste trabalho. Esse fato se dá pela maior capacidade dos testes moleculares em identificar verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, tendo em vista sua maior competência em detectar a presença de material genético do parasito no material biológico do paciente testado em relação aos métodos parasitológicos (SCHWARZ et al., 2014; GANDASEGUI et al., 2018; SENRA et al., 2018).

Os trabalhos que utilizaram amostra de urina para seus ensaios apresentaram altos valores de sensibilidade, especificidade, razão entre as

prevalências e valores preditivos, especialmente os trabalhos 10 e 13 que obtiveram valores máximos para esses indicadores.

Os ensaios de PCR convencional para amostras de urina se mostraram métodos muito acurados de diagnóstico quando comparados com a qPCR para esse mesmo tipo de amostra, descrita pelo trabalho 5 que, com o objetivo de avaliar a acurácia do novo método após tratamento em massa da população estudada, apresentou o menor valor de sensibilidade dentre os diagnósticos utilizados no artigo, incluindo o KK. O baixo desempenho da técnica pode estar relacionado com a conservação inadequada do DNA extraído das amostras de urina, como informa o próprio autor do trabalho (FUSS et al., 2020). Ademais, outros autores relataram melhores resultados utilizando diferentes métodos de conservação e concentração das amostras utilizadas em seus ensaios (LODH et al., 2014; ANYAN et al., 2020). Ainda assim, o trabalho 5 apresentou melhores resultados de sensibilidade do que a PCR convencional realizada no trabalho 17, que objetivou avaliar a performance de uma PCR, comparando com outros métodos de diagnóstico em uma comunidade com baixa transmissão na Venezuela, utilizando amostras de soro, urina e fezes. As técnicas voltadas para o diagnóstico de *S. mansoni*, que tem como alvo o DNA livre em amostra de urina, possuem limitações quanto ao tamanho da sequência a ser amplificada, além da concentração de DNA presente nesse tipo de amostra, uma vez que nem sempre a quantidade de DNA presente nesse fluido biológico é suficiente para determinar uma condição, nesse caso, a infecção pelo trematoda (UMANSKY et al., 2006; CHEN et al., 2019).

Ainda sobre os trabalhos que tiveram como objetivo avaliar testes moleculares em amostras de urina, o trabalho 20 obteve altos resultados de acurácia utilizando uma reação de LAMP, a depender do método de extração utilizado. Os trabalhos que utilizaram LAMP e foram incluídos nesta revisão (19,20) se mostraram métodos acurados. Na literatura, o LAMP é uma metodologia extremamente explorada por sua alta acurácia e praticidade (LI et al., 2017; HU et al., 2020).

Excerto nos exemplos citados acima, a acurácia dos métodos moleculares foi sempre maior pelo método molecular do que pelo método parasitológico utilizado, assim como nas amostras de fezes, e já retratado na literatura (ENK et al., 2012).

Dos 4 trabalhos que se propuseram a desenvolver uma metodologia de diagnóstico molecular para a esquistossomose mansônica, apenas 3 deles apresentaram resultados para esse tipo de amostra. Os trabalhos 5 e 6 obtiveram altos valores de sensibilidade. Enquanto que o trabalho 5 não apresentou dados de especificidade, os trabalhos 3 e 6 obtiveram altos valores para essa variável. As razões entre as prevalências foram maiores que 1 em todos os casos. Os valores de VPP calculado pelo trabalho 3 foi extremamente baixo, enquanto que o NVP para o mesmo trabalho quase atingiu valor máximo. O NVP do trabalho 5, único valor preditivo apresentado, foi alto. Os valores preditivos positivos e negativos são variáveis diretamente influenciadas pelas sensibilidades, especificidades e prevalência dos testes em determinada população, os resultados desses trabalhos podem ser explicados tanto pelas características populacionais, onde os estudos foram desenvolvidos, quanto por fatores intrínsecos aos testes avaliados (MONAGHAN et al., 2021; ALTMAN; BLAND, 1994). Embora a concentração de DNA livre nas amostras de soro variem dependendo de alguns fatores, os ensaios que se propuseram a utilizar esse tipo de amostra se mostraram bastante eficientes em relação a sua acurácia. Entretanto, pelo mesmo motivo, o trabalho 17, que avaliou sua reação de PCR frente às amostras de urina e fezes, não apresentou resultados suficientes para suas análises utilizando amostras de soro.

CONCLUSÃO

Diante do apresentado neste trabalho, os diagnósticos moleculares da esquistossomose mansônica são ótimas alternativas de diagnóstico para a esquistossomose e podem atuar como ferramenta de controle da doença a nível mundial. As amostras de fezes, além de mais estudadas, apresentaram alta acurácia para regiões com endemicidade e níveis de transmissão diferentes, assim como as amostras de urina, que demonstraram alto potencial de desenvolvimento futuro. As amostras de soro foram as que

menos foram incluídas no trabalho e as que apresentaram menor acurácia, embora demonstrem potencial para serem utilizadas também como alternativa de diagnóstico se melhor estudadas. Dito isso, esse trabalho demonstra a necessidade de mais estudos acerca do diagnóstico molecular da esquistossomose mansônica, a fim de solucionar o grande problema da baixa acurácia dos métodos parasitológicos utilizados atualmente, principalmente em áreas de baixa endemicidade para a doença.

RREFERÊNCIAS

ABOU-EL-NAGA, Iman F. et al. *Biomphalaria* species in Alexandria water channels. **Parasitology International**, v. 60, n. 3, p. 247-254, 2011.

ALTMAN, Douglas G.; BLAND, J. Martin. Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values. **Bmj**, v. 309, n. 6947, p. 102, 1994.

ANYAN, William K. et al. Assessment of dual schistosome infection prevalence from urine in an endemic community of Ghana by molecular diagnostic approach. **Parasite epidemiology and control**, v. 9, p. e00130, 2020.

BARBOSA, Constança Simões et al. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta tropica**, v. 164, p. 10-16, 2016.

BARBOSA, Constança S. et al. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, p. 110-114, 2017.

BARBOSA, C. S.; GOMES, E. C. S.; NETO, O. B. L. **Manual prático para o diagnóstico e controle da esquistossomose**. 3 ed, v. 1, Recife: Editora Universitária, 2017. 95p

BÄRENBOLD, Oliver et al. Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005953, 2017.

BEZERRA, Fernando Schemelzer Moraes et al. Evaluating a point-of-care circulating cathodic antigen test (POC-CCA) to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic area in north-eastern Brazil. **Acta tropica**, v. 182, p. 264-270, 2018.

BRUSCKY, Igor Silvestre et al. Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: a promising method. **Journal of the neurological sciences**, v. 366, p. 87-90, 2016.

CASAVECHIA, Maria Teresinha Gomes et al. Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma mansoni* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1000-1014, 2018.

CHEN, Wei et al. Potential use of transrenal DNA for non-invasive monitoring and prognosis of colorectal cancer. **Biomarkers**, v. 24, n. 6, p. 524-529, 2019.

DO CARMO MAGALHÃES, Fernanda et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction to detect *Schistosoma mansoni*-infected individuals from an endemic area with low parasite loads. **Parasitology**, v. 147, n. 10, p. 1140-1148, 2020.

ENK, Martin Johannes; OLIVEIRA E SILVA, Guilherme; RODRIGUES, Nilton Barnabé. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38947, 2012.

FERRER, Elizabeth et al. Diagnostic performance of parasitological, immunological and molecular tests for the diagnosis of *Schistosoma mansoni*

infection in a community of low transmission in Venezuela. **Acta tropica**, v. 204, p. 105360, 2020.

FUSS, Antje et al. Comparison of sensitivity and specificity of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infections in school children in Mwanza region, Tanzania. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202499, 2018.

FUSS, Antje; MAZIGO, Humphrey Deogratias; MUELLER, Andreas. Evaluation of serum-based real-time PCR to detect *Schistosoma mansoni* infection before and after treatment. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2020.

GANDASEGUI, Javier et al. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006314, 2018.

HU, Xuejiao et al. Development and clinical application of a rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for SARS-CoV-2 infection. **MSphere**, v. 5, n. 4, p. e00808-20, 2020.

KATZ, Naftale et al. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses. 2018.

LEEFLANG, Mariska MG et al. Variation of a test's sensitivity and specificity with disease prevalence. **Cmaj**, v. 185, n. 11, p. E537-E544, 2013.

LI, Yanmei et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 54-61, 2017.

LIN, Dan-Dan et al. Evaluation of IgG-ELISA for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* in a high prevalence, low intensity endemic area of China. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 128-133, 2008.

LODH, Nilanjan et al. Detection of parasite-specific DNA in urine sediment obtained by filtration differentiates between single and mixed infections of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* from endemic areas in Ghana. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91144, 2014.

MCMANUS, Donald P. et al. Schistosomiasis. **Nature reviews Disease primers**, [s. l.], v. 4, ed. 13, p. 1-19, 9 ago. 2018. DOI 10.1038/s41572-018-0013-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30093684/>. Acesso em: 3 dez. 2021.

MEURS, Lynn et al. Diagnosing polyparasitism in a high-prevalence setting in Beira, Mozambique: detection of intestinal parasites in fecal samples by microscopy and real-time PCR. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005310, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Guia de vigilância em saúde: volume único. 2019.

MONAGHAN, Thomas F. et al. Foundational Statistical Principles in Medical Research: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value. **Medicina**, v. 57, n. 5, p. 503, 2021.

NATEGHI ROSTAMI, Mahmoud et al. Performance of a universal PCR assay to identify different *Leishmania* species causative of Old World cutaneous leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2020.

NOTOMI, Tsugunori et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 28, ed. 12, 15 abr. 2015. DOI 10.1093/nar/28.12.e63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10871386/>. Acesso em: 3 dez. 2021.

NOYA, Oscar et al. Schistosomiasis in America. In: **Neglected tropical diseases-Latin America and the Caribbean**. Springer, Vienna, 2015. p. 11-43.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Schistosomiasis. *In*: Schistosomiasis. [S. l.], 18 maio de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 3 dez. 2021.

OLIVEIRA, Warllem Junio et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006232, 2018.

PINHEIRO, Marta Cristhiany Cunha et al. Burden of schistosomiasis-related mortality in Brazil: epidemiological patterns and spatial–temporal distribution, 2003–2018. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 11, p. 1395-1407, 2020.

PONTES, Luís André; DIAS-NETO, Emmanuel; RABELLO, Ana. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 2, p. 157-162, 2002.

REY, Luís *et al.* PARASITOLOGIA: Parasitas e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 910 p. ISBN 978-85-277-1406-8.

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

SANOGO, Benjamin et al. RETRACTED: diversity and compatibility of human schistosomes and their intermediate snail hosts. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 6, p. 493-510, 2018.

SANTOS, Israel Gomes de Amorim et al. New epidemiological profile of schistosomiasis from an area of low prevalence in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

SCHWARZ, Norbert G. et al. Schistosoma mansoni in schoolchildren in a Madagascan highland school assessed by PCR and sedimentation microscopy and Bayesian estimation of sensitivities and specificities. **Acta tropica**, v. 134, p. 89-94, 2014.

SILVA, JRM., NEVES, RH., and GOMES, DC. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do Schistosoma mansoni. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 43-84. ISBN 978-85-7541-370-8

SILVA, Luciano K. et al. The changing profile of schistosomiasis in a changing urban landscape. **International journal for parasitology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 2020.

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

UMANSKY, Samuil R.; TOMEI, L. David. Transrenal DNA testing: progress and perspectives. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 6, n. 2, p. 153-163, 2006.

VAN LIESHOUT, Lisette et al. Analysis of worm burden variation in human Schistosoma mansoni infections by determination of serum levels of

circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 5, p. 1336-1342, 1995.

VAN DAM, Govert J. et al. A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 274-282, 2013

VEERMAN, J. L. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. 2017.

WEERAKOON, Kosala GAD et al. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 4, p. 939-967, 2015.

WEERAKOON, Kosala G. et al. Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite cell-free DNA detection in diverse clinical samples. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. 12, p. 1611-1622, 2017.

World Health Organization. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: number of people treated in 2017. *Weekly Epidemiological Record*, N. 50, 2018. p. 681-692

XU, Jing et al. Evaluation of immunoassays for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection using archived sera. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. e949, 2011.

ZHOU, Xiao-Nong et al. Tools to support policy decisions related to treatment strategies and surveillance of *Schistosomiasis japonica* towards elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 12, p. e1408, 2011.

