

## VALORACIÓN DE LA TÉCNICA SmMIT-LAMP PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE ADN DE *Schistosoma mansoni* EN MUESTRAS DE ORINA

### *Assessment of the SmMIT-LAMP Technique for the Molecular Detection of Schistosoma mansoni DNA in Urine Samples*

Cristina MARTÍN; Pedro FERNÁNDEZ-SOTO; Antonio MURO

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Unidad de Investigación acreditada por la Junta de CyL «Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO)». Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Facultad de Farmacia, Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca, España

Correo-e: ama@usal.es

**RESUMEN:** *Antecedentes:* La esquistosomosis humana es una de las enfermedades parasitarias más frecuentes en todo el mundo. Su principal problema reside en el control de la enfermedad debido a las limitaciones de las técnicas parasitológicas y serológicas. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico capaces de detectar la infección en fase aguda. Un enfoque prometedor es la técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*).

*Metodología / Resultados:* Se utilizó un modelo murino de *Schistosoma mansoni* para obtener muestras de orina a partir de ratones infectados con cercarias de *S. mansoni*. Las muestras se recogieron semanalmente desde la semana 0 hasta la semana 8ª después de la infección. Posteriormente se realizó al análisis de las muestras de orina mediante la técnica SmMIT-LAMP, consiguiendo detectar ADN de *S. mansoni* desde la 3ª semana post-infección (p.i).

*Conclusiones / Importancia:* Hemos logrado, por primera vez, la detección de ADN de *S. mansoni* en muestras de orina en fase aguda de la infección

producida por *S. mansoni* mediante un método molecular sencillo, rápido, económico y potencialmente aplicable en zonas endémicas.

*Palabras clave:* *Schistosoma mansoni*; ratones; muestras de orina; diagnóstico; LAMP.

**ABSTRACT: Background:** Human schistosomiasis, is one of the most common parasitic diseases worldwide. Parasitological and serological techniques have different shortcomings to control this illness. Therefore, the development of new diagnostic methods to detect infection in acute phase is required. Loop-mediated isothermal amplification technique (LAMP) could be a good choice.

*Methodology / Results:* Firstly, experimental model was used to obtain urine samples from mice infected with cercariae of *S. mansoni*. The samples were collected weekly from week 0 to 8th post-infection. Finally, SmMIT-LAMP technique was performed to analyse urine samples DNA of *S. mansoni* was detected since 3rd week post-infection.

*Conclusions / Significance:* We have detected, for the first time in acute phase, DNA of the *S. mansoni* in urine samples of infected mice, using a simple, rapid, inexpensive, and potentially applicable method to the diagnosis of schistosomiasis in endemic areas.

*Key words:* *Schistosoma mansoni*; Mice; Urine samples; Diagnosis; LAMP.

## 1. INTRODUCCIÓN

La esquistosomosis (también llamada bilharziosis) es una enfermedad tropical producida por gusanos platelmintos de la clase *Trematoda* y del género *Schistosoma*. Constituye un serio problema de salud a nivel mundial (Suzuki *et al.*, 2006) y está considerada la segunda mayor causa de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones parasitarias, solo después de la malaria (Beltran *et al.*, 2008).

El principal problema que presenta el control de la esquistosomosis reside en el diagnóstico, debido a las limitaciones de las técnicas parasitológicas (falta de sensibilidad, especialmente en infecciones leves, incapacidad de detectar infección aguda, etc.) (Berhe *et al.*, 2004) y de las técnicas serológicas (problemas en la obtención de anticuerpos, reactividad cruzada, falsos positivos tras quimioterapia, incapacidad de detectar infección aguda) (Doenhoff *et al.*, 2004). Para superar estas limitaciones han surgido métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) con elevada especificidad y sensibilidad en el diagnóstico. Sin embargo, requieren de infraestructura y material

costosos y personal cualificado por lo que no son útiles en el diagnóstico de la enfermedad en zona endémica (Fernández-Soto *et al.*, 2014).

Una posible alternativa es la técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) descrita por Notomi *et al.* (2000). El LAMP permite la detección de ADN con alta especificidad y sensibilidad; utiliza una ADN polimerasa (*Bst* polimerasa) con actividad de desplazamiento de cadena junto con 4 o 6 cebadores que reconocen seis u ocho regiones en el ADN diana. Su mayor ventaja es la posible detección visual de los resultados bien por turbidez o por cambio de color (Tomita *et al.*, 2008). No requiere de equipos sofisticados, por lo que es una técnica con gran potencial en el diagnóstico de campo de la enfermedad.

Recientemente, en el Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS (Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca), se ha diseñado y puesto a punto un método LAMP (SmMIT-LAMP) para la detección sensible y específica de ADN de *S. mansoni* en muestras de heces de ratones infectados experimentalmente con el parásito. El LAMP diseñado permitió la detección del ADN de *S. mansoni* en muestras de heces desde la primera semana post-infección (p.i.) permitiendo así el diagnóstico en fase aguda de la enfermedad. Además, el método puede ser potencialmente aplicable a muestras de heces humanas. (Fernández-Soto *et al.*, 2014).

Sin embargo, las muestras de heces presentan generalmente problemas asociados a su recogida, procesamiento y almacenamiento; además, han de obtenerse de forma seriada y tienen mala aceptación por parte del paciente (Sandoval *et al.*, 2006). Las muestras de orina resultarían más fáciles de obtener, procesar y almacenar para la aplicación de un método de diagnóstico eficaz de la esquistosomosis.

## 2. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general del trabajo fue aplicar y valorar el método SmMIT-LAMP por primera vez para la detección de *S. mansoni* en muestras de orina de ratones infectados experimentalmente con el parásito.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Mantenimiento del ciclo biológico de *S. mansoni* en el laboratorio.
2. Infección experimental de ratones con *S. mansoni*.
3. Obtención de muestras de orina de ratones infectados.
4. Análisis de las muestras de orina mediante SmMIT-LAMP.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

El material y métodos utilizados en la realización del presente trabajo se corresponden principalmente a las actividades que se describen a continuación:

#### 3.1. Mantenimiento del ciclo biológico de *S. mansoni*

El ciclo biológico de *S. mansoni* se mantiene de forma rutinaria en el laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS. Las cercarias (fase infectiva del parásito) se obtuvieron a partir de caracoles de la especie *Biomphalaria glabrata* previamente infectados con miracidios de *S. mansoni* en condiciones experimentales. Esta fase se utiliza para realizar la infección de ratones.

#### 3.2. Infección experimental y recogida de muestras

Se infectaron un total de 5 ratones hembra CD1 con 150 cercarias/ratón siguiendo la técnica de infección percutánea por inmersión descrita por Césari *et al.* (1987). Para la obtención de las muestras de orina se utilizó una jaula metabólica, que permite la recogida por separado de heces y orina en distintos recipientes, como describe Kurien *et al.* (2004). Las muestras se recogieron diariamente en forma de *pool* durante las 8 semanas que duró la infección y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ADN para su análisis. En la figura 1 se muestra un esquema del experimento de infección y recogida de muestras.

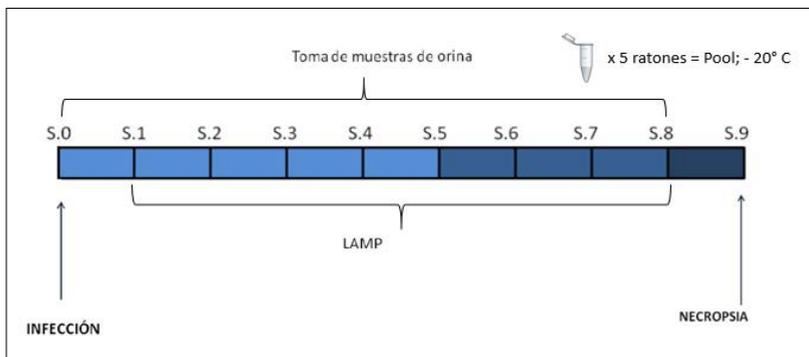


FIGURA 1: Esquema general del experimento: infección y toma de muestras.  
S.0: infección con 150 cercarias/ratón; S.1-S.9: semanas post-infección.

A la 9ª semana post-infección (p.i.), los ratones se eutanzaron en una cámara de  $\text{CO}_2$  para realizar las necropsias. Para valorar y confirmar la infección se

realizaron una serie de medidas parasitológicas tales como: recuento de huevos por gramo de hígado e intestino, número de vermes adultos y de granulomas por centímetro cuadrado de superficie hepática. Estos procedimientos se llevaron a cabo según la metodología descrita por Vicente *et al.* (2015).

### 3.3. *Procesamiento de las muestras: obtención de ADN*

Para la extracción del ADN se utilizaron únicamente los *pools* de orina recogidos desde la 1ª semana a la 8ª semana p.i.. Para la extracción del ADN se partió de un volumen de 100 µL de orina y se utilizó el kit comercial *i-genomic Urine DNA Extraction Mini Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se midió la concentración de ADN de cada muestra en un Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

También se obtuvo ADN a partir de gusanos adultos congelados de *S. mansoni* para su uso como control positivo en las diferentes reacciones de Sm-MIT-LAMP. Para su extracción se utilizó el kit comercial *Dneasy Blood & Tissue kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN obtenida también se midió con el Nanodrop y se utilizó a 1 ng/µL como control positivo en los distintos ensayos.

### 3.4. *Análisis de las muestras de orina mediante SmMIT-LAMP.*

Las muestras de orina se analizaron por duplicado mediante SmMIT-LAMP según la metodología descrita en Fernández-Soto *et al.* (2014). Brevemente, la reacción LAMP se llevó a cabo en un termobloque (K Dry-Bath®) a 63°C durante 60 minutos más 5 minutos adicionales para detener la reacción por desactivación de la enzima.

Tras el análisis, los resultados se visualizaron por cambio de color (verde positivo; naranja negativo) mediante la adición de 2 µL del colorante SYBR Green® a los tubos de reacción y mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En el gel de agarosa los resultados positivos se observaron por un patrón de bandas típicamente «en escalera».

## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Valoración de la infección*

Las magnitudes parasitológicas evaluadas se expresan a continuación en términos de media y desviación estándar: número de huevos por gramo de hígado (377±210) e intestino (297±38,5), de vermes adultos (11±7,3) y de granulomas por centímetro cuadrado de superficie hepática (185±58,2).

#### 4.2. SmMIT-LAMP en muestras de orina

Los resultados del análisis mediante SmMIT-LAMP de las muestras de orina se muestran en la figura 2. Se obtuvo amplificación en los *pools* de muestras de orina correspondientes a las semanas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 p.i. Los resultados fueron claramente observables por cambio de color y mediante la resolución de las bandas de amplificación en geles de agarosa.

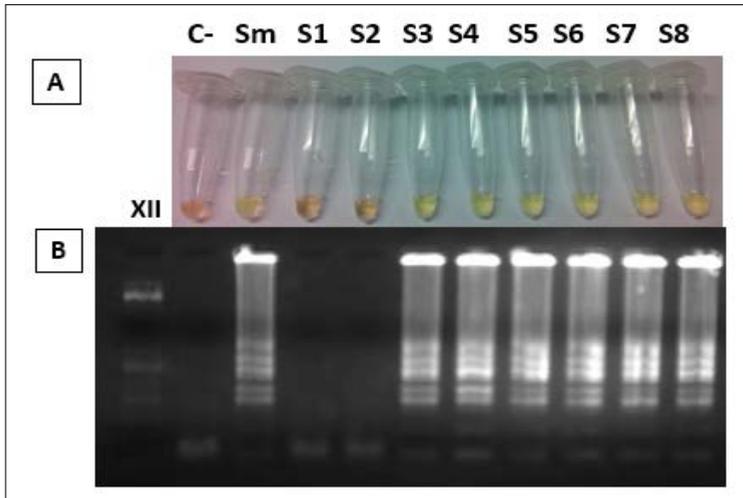


FIGURA 2: SmMIT-LAMP en muestras de orina de ratones infectados con *S. mansoni*. A) Detección con SYBR Green® B) Electroforesis en gel de agarosa. XII, marcador de peso molecular; C-, control negativo (no ADN); Sm, ADN de *S. mansoni* (control positivo) y S1-S8, muestras de orina correspondientes a las semanas 1 a 8 p.i.

#### 5. DISCUSIÓN

La esquistosomosis es una de las enfermedades parasitarias más extendida. *S. mansoni*, el agente causal de la esquistosomosis intestinal humana, es la especie más importante. El diagnóstico de la enfermedad está basado fundamentalmente en métodos parasitológicos y serológicos, pero no son efectivos en la detección de la fase aguda de la enfermedad. Se requieren nuevos métodos moleculares que sean capaces de detectar la infección durante las primeras semanas, permitiendo así un tratamiento temprano y, consiguientemente, la prevención de la patología asociada a las infecciones crónicas. Una aproximación actual es la técnica LAMP que amplifica el ADN con elevada especificidad y sensibilidad. Además, permite la visualización de los resultados a simple vista y no requiere de aparataje sofisticado.

Es, por tanto, una técnica potencialmente aplicable a zonas pobres y endémicas de la enfermedad.

En el Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS, (Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca), recientemente se ha diseñado y puesto a punto un método LAMP (SmMIT-LAMP) para la detección sensible y específica de ADN de *S. mansoni* en muestras de heces de ratones infectados experimentalmente con el parásito (Fernández-Soto *et al.*, 2014). Se consiguió la detección de ADN de *S. mansoni* en muestras de heces en la primera semana p.i. y, por tanto, en fase aguda de la enfermedad. El método puede ser potencialmente aplicable a muestras de heces humanas para el diagnóstico de la esquistosomosis.

Sin embargo, la recogida de muestras de heces de pacientes tiene grandes desventajas como su almacenamiento y procesamiento, su toma de forma seriada para aumentar la sensibilidad e incluso la peor aceptación por parte del paciente. Las muestras de orina, sin embargo, presentan una recogida con mayor aceptación por parte del paciente, pueden obtenerse de pacientes de cualquier edad y su almacenamiento y procesamiento es más sencillo que las muestras de heces. Además, la técnica LAMP ya ha sido utilizada con éxito en muestras de orina para la detección de diversos patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos (Fernández-Soto *et al.*, 2013). Así pues, nos planteamos aplicar y valorar el método SmMIT-LAMP en muestras de orina de un modelo murino controlado de infección experimental con *S. mansoni*.

En estudios anteriores se ha demostrado que la infección por *S. mansoni* en ratones puede detectarse parasitológicamente a partir de la 5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> semana p.i. (cuando aparecen huevos en heces) y serológicamente a partir de la 5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> semana p.i. (Sandoval *et al.*, 2006). Por tanto, estos métodos no resultan útiles para detectar la infección en fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, utilizando el SmMIT-LAMP hemos conseguido detectar el ADN de *S. mansoni* en muestras de orina a la 3<sup>a</sup> semana p.i., cuando la infección se encuentra en su fase aguda.

Por tanto, en el presente trabajo se ha conseguido por primera vez la detección de ADN de *S. mansoni* en muestras de orina mediante un método molecular sencillo, rápido y económico como es la técnica LAMP. Las ventajas adicionales de las muestras de orina frente a las de heces hacen del método SmMIT-LAMP una herramienta potencialmente útil para el diagnóstico de la esquistosomosis en población humana en zonas endémicas de la enfermedad.

## 6. CONCLUSIÓN

El método SmMIT-LAMP ha permitido, por primera vez, el diagnóstico en fase aguda de una infección por *S. mansoni* en muestras de orina de ratones infectados experimentalmente con el parásito.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- BELTRAN, S., GALINIER, R., ALLIENE, J. F. y BOISSIER, J.: Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103: 501-3.
- BERHE, N., MEDHIN, G., ERKO, B., SMITH, T., GEDAMU, S. *et al.*: Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. 2004; 92: 205-212.
- CESARI, I. M., y ALARCÓN DE NOYA, B.: Esquistosomiasis mansoni: diagnóstico y control. Manual de campo y de laboratorio. 1987.
- DOENHOFF, M. J., CHIODINI, P. L. y HAMILTON, J. V.: Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies. Trends Parasitol. 2004; 20: 35-39.
- FERNÁNDEZ-SOTO, P., MVOULOUGA, P. O., AKUE, J. P., ABÁN, J. L., SANTIAGO, B. V., SÁNCHEZ, M. C. y MURO, A.: Development of a highly sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for the detection of *Loa loa*. PLoS One. 2014; 9: e94664.
- FERNÁNDEZ-SOTO, P., GANDASEGUI ARAHUETES, J., SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, A., LÓPEZ ABÁN, J., VICENTE SANTIAGO, B. y MURO, A.: A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: A diagnostic approach in a murine model. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8: e3126.
- FERNÁNDEZ-SOTO, P., TIRADO, V. V., RODRÍGUEZ, C. C., PÉREZ-ARELLANO, J. L. y MURO, A.: Long-term frozen storage of urine samples: a trouble to get PCR results in *Schistosoma* spp. DNA detection. PLoS One. 2013; 8: e61703.
- KURIEN, B. T., EVERDS, N. E. y SCOFIELD, R. H.: Laboratory Animals. 2004; 38: 333J361.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28: E63.
- SANDOVAL, N., SILES-LUCAS, M., PEREZ-ARELLANO, J. L., CARRANZA, C., PUENTE, S., LOPEZ-ABAN, J. y MURO, A.: A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. Parasitology. 2006; 133: 581-587.
- SMITHERS, S. R. y TERRY, R. J.: The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology. 1965; 55: 695-700.
- TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H. y NOTOMI, T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc. 2008; 3: 877-882.
- VICENTE, B., LÓPEZ-ABÁN, J., ROJAS-CARABALLO, J., DEL OLMO, E., FERNÁNDEZ-SOTO, P., RAMAJO-MARTÍN, V. y MURO, A.: The combination of the aliphatic diamine AA0029 in ADAD vaccination system with a recombinant fatty acid binding protein could be a good alternative for the animal schistosomiasis control. Exp Parasitol. 2015; 154: 134-142.