Rafael Correa do Nascimento

**Identificação de alvos para o diagnóstico molecular gênero específico da
estrongiloidíase experimental**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientador: Dra. Fabiana Martins de Paula

São Paulo

2020

*Para Deus por me permitir sonhar e
acreditar que um dia isso seria possível, por
todas as dificuldades superadas, por ser meu
refúgio e fortaleza.*

*A minha mãe Marcia Correa Nunes,
irmã Fernanda Nascimento e Silva, madrinha
Maria Carniato e ao Saulo Oliveira, por serem
meu suporte, incentivo e por acreditarem no meu
potencial.*

*Aos meus amigos Verônica Lopes, André
de Paula, Eliane e Elisangela Sales, Gabriela
Santana, Cinthia Lays, Luiz Rostello, Douglas
Eulálio, Weber Castro, Jorge Henrique, Bruno
Angelini, Lais Costa, Ataluana Rodrigues,
Tatiane Vieira e Eduardo Jerez por serem os
melhores possíveis, pelos conselhos e vibração a
cada conquista.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a peça principal em minha vida, Deus, que sempre se mostrou presente nos momentos mais difíceis dessa trajetória, mostrando que sempre é possível alcançar meus objetivos e me dando forças para concluir esse trabalho.

À minha família, minha mãe Marcia Correa Nunes, minha irmã Fernanda Correa do Nascimento e Silva, a minha madrinha Maria Carniato, ao Saulo Oliveira, meu Primo André dos Santos, e aos meus amigos, por serem meus maiores incentivadores, por sempre acreditarem que tudo iria dar certo, me incentivando, acreditando no meu potencial e me ajudando com atitudes e palavras. Amo vocês demais. Sem vocês eu provavelmente não conseguiria chegar até aqui. Obrigado por me ajudar a realizar meu sonho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek por ser um espelho e fonte de inspiração no meu caminhar, por ter me aceitado em seu laboratório e permitido a realização desse trabalho, Obrigado.

À Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula, pesquisadora científica do laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose do Laboratório de Investigação Médica (LIM06) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por aceitar ser minha orientadora, me instruindo, desenvolvendo, pelo tempo em me orientar, paciência e mostrando qual a melhor forma e caminho para a chegada final.

À minha amiga MSc. Gessica Melo, pela amizade e força ao longo destes últimos anos, e por todos os ensinamentos laboratoriais para realização deste trabalho, pelas risadas e por embarcar comigo nessa jornada, por me ajudar a estudar, por aguentar os momentos difíceis que passei durante esse período, por ser além de amiga uma professora, por me incentivar e mostrar que a luta é árdua mais a vitória é certa. Me faltam palavras para agradecer, obrigado pelo carinho, pela dedicação e por ser esse exemplo de pessoa e profissional.

A todos os funcionários do Laboratório de Investigação Médica (LIM06) e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, que de forma direta ou indireta, me deram incentivo para a concretização deste trabalho.

A duas pessoas muito especiais em minha trajetória profissional Mayra Cizotto e Caroline Ferreira, obrigado por todos os conselhos, por acreditar no meu potencial e a cada dia me incentivar a ser melhor profissionalmente, sou muito grato a tudo que me proporcionou e está me proporcionando, serei grato eternamente.

À Eliane Araújo, secretária do programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por toda ajuda e disposição para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela oportunidade de realização deste trabalho.

"Devemos sempre mudar, renovar, rejuvenescer a nós mesmos caso contrário endurecemos"

(Johann Wolfgang von Goethe)

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota..."

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

Nascimento RC. Identificação de alvos para o diagnóstico molecular gênero específico da estrogiloidíase experimental. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Strongyloides venezuelensis tem sido utilizado em diferentes estudos experimentais, sobretudo aqueles que objetivam avaliar técnicas para o diagnóstico da estrogiloidíase. No presente trabalho, três regiões alvos (gênero, 18S e 28S) do DNA ribossomal de *S. venezuelensis* foram avaliadas para o diagnóstico molecular da estrogiloidíase experimental. Os ratos foram infectados por via subcutânea com 400 e 4.000 larvas infectantes por *S. venezuelensis* em dois grupos (400L3 e 4.000L3) e mantidas por 35 dias. Amostras fecais foram coletadas diariamente para contar ovos por grama de fezes (OPG) e realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR). A eliminação de ovos nas fezes se iniciou no 5º dia pós-infecção (d.p.i.) e terminou nos 33º e 34º d.p.i., nos grupos 400L3 e 4.000L3, respectivamente. Considerando a PCR-Gênero, a amplificação do alvo ocorreu do 6º ao 29º d.p.i. (400L3) e do 6º ao 34º d.p.i. (4.000L3). Para PCR-18S, a amplificação do fragmento alvo foi do 5º ao 30º d.p.i. (400L3), e do 5º ao 31º d.p.i. (4.000L3). Em relação a PCR-28S, pode-se observar que a amplificação do fragmento alvo ocorreu do 1º a 34º d.p.i. (400L3), e do 1º ao 35º d.p.i. (4.000L3). Com base na OPG, as amostras fecais dos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º d.p.i. foram selecionadas para extração de DNA; seguida pela PCR (gênero, 18S e 28S); e sequenciamento. As sequências obtidas dos produtos PCR-28S apresentaram 95 a 100% de identidade com as sequências de *Strongyloides*, para ambos os inoculos. Com isso, é possível reforçar a aplicação da PCR-28S no diagnóstico de estrogiloidíase experimental e humana.

Descritores: Estrogiloidíase; Reação em Cadeia Polimerase; Diagnóstico Molecular; DNA Ribossomal.

ABSTRACT

Nascimento RC. Identification of targets for the specific molecular diagnosis of the experimental strongyloidiasis. (Dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Strongyloides venezuelensis has been used in different experimental studies, such as those aimed at the evaluation of diagnostic techniques for strongyloidiasis. In this study, three regions (genus, 18S and 28S targets) of *S. venezuelensis* ribosomal DNA were evaluated for the molecular diagnosis of experimental strongyloidiasis. Rats were infected subcutaneously with 400 or 4,000 *S. venezuelensis* infective larvae (400L3 and 4,000L3), and kept for 35 days. Fecal samples were collected daily to count eggs per gram of feces (EPG) and to perform the polymerase chain reaction (PCR). EPG started on the 5th day post-infection (pi) and ended on days 33 and 34 pi, in 400L3 and 4,000L3 groups, respectively. PCR-genus the amplification occurred from days 6 to 29 p.i. (400L3) and 6 to 34 p.i. (4,000L3). For PCR-18S, the amplification of the target fragment was from days 5 to 30 p.i. (400L3), and days 5 to 31 p.i. (4,000L3). Regarding the PCR-28S, it can be seen that the amplification of the target fragment was from days 1 to 34 pi (400L3) and days 1 to 35 pi (4,000L3). Based in EPG, fecal samples were selected from days 2, 5, 8, 11, 15, 23 and 35 pi for new DNA extraction; a new PCR (genus, 18S and 28S); and sequencing. The PCR-28S products showed 95-100% values of identity in the database with the *Strongyloides* sequences. Therefore, it is possible to reinforce the application of PCR-28S in the diagnosis of strongyloidiasis experimental and human.

Descriptors: Strongyloidiasis; Polymerase Chain Reaction; Molecular diagnosis; Ribosomal DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das formas evolutivas de <i>S. stercoralis</i>	05
Figura 2. Ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	07
Figura 3. Amplificação de DNA utilizando os diferentes iniciadores da subunidade ribossomal de <i>Strongyloides</i>	30
Figura 4. Amplificação de DNA, proveniente de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	31
Figura 5. Amplificações de DNA utilizando as diferentes regiões alvos da subunidade ribossomal de <i>Strongyloides</i> para teste de especificidade.....	32
Figura 6. Amplificação de DNA utilizando a região alvo gênero em dias alternados da infecção no modelo experimental.....	33
Figura 7. Amplificação de DNA utilizando a região alvo 18S em dias alternados da infecção no modelo experimental	33
Figura 8. Amplificação de DNA utilizando a região alvo 28S em dias alternados da infecção no modelo experimental.....	34
Figura 9. Amplificação de DNA, utilizando os alvos Gen (~340bp), 28S (~181bp) e 18S (~101bp) a partir de amostras de DNA obtido de larva de <i>S. venezuelensis</i> ...	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eventos importantes relacionados a descoberta do nematódeo parasito <i>Strongyloides stercoralis</i>	02
Tabela 2. Alvos para reação da PCR da detecção de DNA de <i>S. venezuelensis</i> nas amostras fecais de ratos experimentalmente infectados.....	23
Tabela 3. Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de animais infectados experimentalmente com 400 e 4.000 larvas filarioide de <i>S. venezuelensis</i> . Os valores estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão, considerando as cinco contagens em cada dia pós infecção (d.p.i)	29
Tabela 4. Amplificação dos alvos utilizando as regiões alvo Gen, 28S e 18S, ao longo da cinética experimental dos animais infectados com 400 e 4.000 larvas filarioide de <i>S. venezuelensis</i>	34

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais experimentalmente com 400 e 4.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Os valores representam a média do número de ovos liberados durante os 35 d.p.i. (dias pós infecção)27
- Gráfico 2.** Representação da intensidade de visualização das bandas no gel de agarose nos dois grupos (400L3= A, 4.000L3 =B) utilizando os três alvos (Gen, 18S e 28S), em relação aos dias pós-infecção e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG)39
- Gráfico 3.** Qualidade das sequencias obtidas utilizando os três alvos (Gen, 18S, 28S) nos dois grupos (400L3 e 4.000L3) ao longo da cinética experimental. Considerando o valor de qualidade >30% segundo o programa *Eletropherogram quality analysis*40

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Intensidade de visualização das bandas alvos no gel de agarose utilizando os três iniciadores (Gen, 18S e 28S) em relação a positividade da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) obtido das amostras dos animais infectados com 400L3, ao longo da cinética experimental.....36
- Quadro 2.** Intensidade de visualização das bandas alvos no gel de agarose utilizando os três iniciadores (Gen, 18S e 28S) em relação a positividade da contagem de ovos por gramas de fezes obtido das amostras dos animais infectados com 4.000L3, ao longo da cinética experimental.....37
- Quadro 3.** Similaridade com as sequencias depositadas na base de dados dos produtos de PCR a partir do DNA obtidos nos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.) dos animais infectados com 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*, utilizando a região alvo Gênero (Gen)40
- Quadro 4.** Similaridade com as sequencias depositadas na base de dados dos produtos de PCR a partir do DNA obtidos nos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.) dos animais infectados com 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*, utilizando a região alvo 18S41
- Quadro 5.** Similaridade com as sequencias depositadas na base de dados dos produtos de PCR a partir do DNA obtidos nos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.) dos animais infectados com 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*, utilizando a região alvo 28S41
- Quadro 6.** Comparação dos resultados da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) e dos testes moleculares (Gen, 18S e 28S) considerando os dois grupos de animais (400L3 e 4.000L3), ao longo da cinética experimental.....43

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

bp – Pares de base

CN – Controle negativo

CEUA – Comissão de Ética no uso de animais

CONCEA – Conselho Nacional de controle de experimentação animal

CP – Controle positivo

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPS – Desorribonucleotideos fosfato

d.p.i – Dias pós infecção

ELISA - Ensaio imunoenzimático

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IL – Interleucina

IMT-USP – Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

kg – Kilo

L1-L2 – Larvas rabditoides

L3 – Larvas filarioides

mA – Miliamper

mg – Miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitros

mm – Milímetros

ng – Nanogramas

NaCL – Cloreto de Sódio

OPG – Ovos por gramas de fezes

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PM – Padrão de peso molecular

Pmol – Picomol

qPCR – reação em cadeia polimerase em tempo real

rDNA – Ácido Desoxirribonucleico ribossomal

Rpm – Rotações por minuto

µm – Micrometros

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Aspectos gerais: <i>Strongyloides stercoralis</i> e estrogiloidíase	01
1.2 Descoberta do parasito <i>Strongyloides stercoralis</i> e a identificação de seu ciclo biológico	02
1.3 Aspectos morfo-biológicos	03
1.4 Ciclo biológico	06
1.5 Aspectos clínicos	08
1.6 Resposta imune	09
1.7 Diagnóstico da estrogiloidíase	10
1.7.1 Parasitológico	10
1.7.2 Sorológico	11
1.7.3 Molecular	12
1.8 Modelo experimental	14
1.8.1 <i>Strongyloides venezuelensis</i>	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 Objetivos	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivo específico	17
4 Materiais e Métodos	18
4.1 Aspectos éticos	18
4.2 Obtenção da larva infectante (L3) de <i>S. venezuelensis</i>	18
4.3 Grupo experimental	19
4.4 Diagnóstico parasitológico	19
4.5 Técnicas moleculares	20
4.5.1 Extração de DNA das amostras de fezes	20
4.5.2 Extração de DNA de outros parasitos	22
4.5.3 Alvos	22
4.5.4 Reação da cadeia em polimerase (PCR)	23
4.5.5 Eletroforese	23
4.5.6 Reação de sequenciamento	24
4.5.7 Análise molecular	25
4.6 Análise de dados	26
5 Resultados	27
5.1 Diagnóstico parasitológico	27
5.2 Diagnóstico molecular de <i>S. venezuelensis</i>	29
5.2.1 Análise dos alvos	30
5.2.2 Avaliação das técnicas moleculares	32
5.2.2.1 Picos selecionados na cinética experimental	32
5.2.2.2 Cinética experimental completa	35
5.3 Sequenciamento	40
6 Discussão	45
7 Conclusão	55
8 Bibliografia	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais: *Strongyloides stercoralis* e estrongiloidíase

Strongyloides stercoralis é um nematoide intestinal com distribuição mundial, apresentando alta prevalência em países de clima tropical e subtropical, sendo o homem o principal reservatório e fonte de infecção¹. Até o momento foram descritas 52 espécies, sendo somente duas com potencial patogênico para o homem: *Strongyloides fuelleborni*, com ocorrência em primatas não humanos, limitado no continente Africano e Papua Nova Guiné; e *Strongyloides stercoralis*, com ocorrência mundial¹. No Brasil, a importância desse parasito como agente etiológico da estrongiloidíase foi descrita por Ribeiro e da Luz em 1880².

A prevalência do parasito no mundo foi classificada em três categorias por Stuerchler (1981): casos esporádicos (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%)³. Estima-se que 10 a 40% da população mundial esteja infectada pelo parasito nos países tropicais e subtropicais, chegando a 60% em países em desenvolvimento⁴. Baseando-se nesta definição, algumas regiões brasileiras podem ser consideradas hiperendêmicas com positividade superior a 5%. No Brasil a ocorrência média da infecção por *S. stercoralis* é de 5,5%, sendo Minas Gerais, Alagoas, Santa Catarina, Amazonas e São Paulo os estados com maior ocorrência⁴. No entanto, a grande dificuldade para a determinação da prevalência da estrongiloidíase em uma população se dá principalmente pelo grande número de casos assintomáticos, formas subclínicas crônicas, manifestações clínicas não específicas⁵. *S. stercoralis* é considerado um helminto negligenciado dentre os parasitos causadores de doenças tropicais negligenciadas⁶, principalmente pela não realização de forma adequada do diagnóstico.

1.2 Descoberta do parasito *Strongyloides stercoralis* e a identificação de seu ciclo biológico

No quadro 1 estão apresentados os principais acontecimentos relacionados ao nematódeo *S. stercoralis*, desde sua descoberta, identificação das formas evolutivas, classificação, mecanismos de infecção e aspectos do ciclo biológico².

Tabela 1. Eventos importantes relacionados a descoberta do nematódeo parasito *Strongyloides stercoralis* ^(7;2).

Autor	Ano	Evento
Normand Bavay	1876	Descoberta do parasita Denominou de <i>Anguillula stercoralis</i>
Grassi, Parona, Parona	1878	Descreveram as larvas rabditoides, as fêmeas de vida livre e as larvas filarioides Alteração do nome para <i>Anguillula intestinalis</i>
Grassi	1879	Criou o Gênero <i>Strongyloides</i> , mudando a denominação para <i>Strongyloides intestinalis</i>
Perroncito	1881	Observou a transformação da larva rabditoide em macho e fêmea de vida livre, seguida pela larva filarioide (infectante)
Leuckart	1883	Demonstrou que as formas descritas correspondiam a diferentes fases evolutivas no ciclo de vida de <i>Strongyloides</i>
Stiles, Hassal	1902	Denominaram o parasita como <i>Strongyloides stercoralis</i>
Durme, Ranson	1902 1907	Demonstraram a migração pulmonar e penetração da larva pela pele
Looss	1905	Demonstrou que a infecção ocorria pela penetração da larva pela pele de onde migrava para pulmões, traqueia e intestino
Gage	1911	Demonstrou a ocorrência da auto-infecção
Fuelleborn	1914	Confirmou o ciclo migratório das larvas
Gram	1936 1939	Introduziu o conceito de que as fêmeas parasitos são partenogenéticas

1.3 Aspectos morfo-biológicos

Parasitas do gênero *S. stercoralis* são nematódeos que apresentam seis formas bem diferenciadas no seu ciclo evolutivo: fêmea partenogenética, macho de vida livre, fêmea de vida livre, larva rabditoide, larva filarioide, e ovo conforme (figura 1)^{8;4}.

A fêmea parasita partenogenética, possui o corpo cilíndrico com aspecto filiforme longo, extremidade anterior arredondada e posterior afilada, mede em torno de 2,5mm de comprimento e 0,04mm de largura. Possui uma delgada e transparente cutícula com estriações transversais por toda sua extensão corporal. Apresenta um aparelho digestivo simples formado por uma boca trilabial, esôfago filarioide longo e cilíndrico, ocupando um quarto do seu comprimento total, seguido do intestino simples, reto e ânus em posição transversal na extremidade posterior. O aparelho genital ocupa dois terços do corpo sendo constituído por ovários, ovidutos com ovos enfileirados em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário, vulva ventral no terço médio localizada no terço posterior ao corpo que se comunica com o útero anfidelfo^{8;2;4}.

O macho de vida livre pode ser encontrado no solo. Possui corpo cilíndrico afilado com extremidade posterior recurvada ventralmente e anterior arredondada. Medem aproximadamente 0,7mm de comprimento por 0,04mm de diâmetro, revestimento composto de cutícula delgada e estriada transversalmente. A cavidade digestória é composta por uma boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino simples terminado em uma cloaca localizada na extremidade da região posterior. O sistema reprodutor é composto por testículos, vesícula seminal, canais deferentes, ejaculador que se abre na cloaca e dois espículos que auxiliam na cópula^{7;8;2;4}.

A fêmea de vida livre assim como o macho de vida livre, podem ser encontrados no solo. Possui aspecto fusiforme com extremidade posterior afilada e são menores que as fêmeas partenogenéticas, mede aproximadamente 1,2mm de comprimento por 0,07mm

e de largura, possuem cutícula fina e estriada. Apresenta sistema digestório simples formado pela boca trilabiada, esôfago com uma dilatação bulbar, intestino simples e retilíneo, e ânus na extremidade posterior. O aparelho genital é constituído por uma vulva localizada na região medial do corpo, útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal^{7;2;4}.

As larvas rabditoides (L1/L2) são os primeiros estágios larvários e são facilmente encontradas nas fezes, sendo o principal estágio no diagnóstico da estrogiloidíase. Mede cerca de 0,02 a 0,03mm de comprimento e apresentam uma cutícula fina e hialina. O sistema digestório é composto por um vestíbulo bucal curto e esôfago rabditoide formado por 2 bulbos: um posterior e granuloso, o outro anterior cilíndrico e alongado, tendo uma porção estreita entre os dois. Apresentam primórdio genital bem nítido e sua cauda pontiaguda^{7;2;4}.

As larvas filarioides (L3) também chamada de larva infectante. Medem 0,50mm de comprimento por 0,03mm de largura. Apresentam revestimento com cutícula fina e estriada, vestíbulo bucal curto, esôfago filarioide, intestino longo e estreito, terminando em abertura anal, cauda entalhada característica, o que as diferencia dos ancilostomídeos^{2;9;4}.

Os ovos se apresentam no mesmo formato aos de ancilostomídeo, possuem formato elíptico e embrionado com uma parede fina e transparente. Medindo 0,05mm de comprimento por 0,03mm de largura para os originados da fêmea parasita, já os da fêmea de vida livre são maiores medindo 0,07mm de comprimento por 0,04mm de largura^{8;2;4}.

Figura 1 – Representação esquemática das formas evolutivas de *S. stercoralis*. Adaptado de Costa-Cruz ⁴.

an – ânus; bo – boca; ca – cauda entalhada; cl – cloaca; ep – espículo; es – esôfago; in: intestino; ov – ovário; pg – primórdio genital nítido; te – testículo; ut – útero divergente; vb – vestíbulo bucal curto; vu – vulva.

1.4 Ciclo biológico

O ciclo de vida das espécies do gênero *Strongyloides* é complexo, podendo ocorrer de duas maneiras: o direto (partenogenético) e o indireto (sexuado ou de vida livre) (figura 2)².

A infecção por *S. stercoralis* ocorre pela penetração das larvas L3 ativamente na pele, mucosa oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro, com auxílio da secreção de metaloproteases, que facilitam a penetração e migração pelos tecidos¹⁰. As larvas L3 alcançam a corrente sanguínea chegam ao coração e aos pulmões, ultrapassam os capilares pulmonares e entram nos alvéolos, onde sofrem mudas. Atravessam a membrana

alveolar e chegam nos brônquios de onde migram para a traqueia, chegando na faringe. Nesse momento podem ser expelidas pela expectoração ou serem deglutidas chegando nas criptas da mucosa duodenal, onde atingem a maturação e se transformam em fêmeas parasitos partenogênicas. Estas permanecem nas criptas, principalmente nas glândulas de *Lieberkuühn* e na porção superior do jejuno, onde ocorre a liberação dos ovos embrionados. As larvas L1-L2 eclodem dos ovos larvados, migram para a luz do intestino e são eliminadas nas fezes, podendo seguir um ciclo indireto, ou ciclo direto ².

No ciclo direto as larvas L1/L2 que são eliminadas nas fezes chegam no meio ambiente e em condições favoráveis de temperatura e solo continuam o ciclo, sofrendo mudas para larva L3, e poderão penetrar ativamente a pele humana². No ciclo indireto as larvas L1/L2 em ambiente adequado, irão dar continuidade ao ciclo, passando por 4 mudas originando fêmeas e machos de vida livre, que irão realizar a copula e liberar novos ovos que eclodirão, liberando larvas L1-L2. Caso as larvas liberadas sofram mudas para L3, poderão infectar o homem ¹¹.

Algumas larvas (L1/L2) ainda na luz intestinal de indivíduos infectados, se transformam em larvas L3, processo chamado de autoinfecção interna. É considerado autoinfecção interna quando as larvas L1/L2 transformam em larvas L3 na região perianal de indivíduos infectados, caracterizando autoinfecção interna. O processo de autoinfecção é responsável pela manutenção da infecção duradoura, de meses a anos, até mesmo em indivíduos que não estejam residindo em regiões endêmicas e/ou hiperendêmicas^{8;2;1}.

Figura 2 – Ciclo biológico de *S. stercoralis*¹²

1.5 Aspectos clínicos

As características clínicas decorrentes da infecção causada por *S. stercoralis* estão ligadas a diversos fatores, como grau de infecção parasitária, migração de larvas no ciclo pulmonar, multiplicação e permanência da fêmea partenogenética na mucosa intestinal, além do estado nutricional do hospedeiro¹⁴. Podem ser caracterizadas três formas clínicas: aguda, crônica e disseminada¹. Nas manifestações agudas, os sintomas observados são: lesões papulares pruriginosas e urticárias inespecíficas no local da invasão devido a migração larvária. Com a passagem das larvas pelos pulmões, algumas

manifestações como tosse seca, dispneia e edema podem ser causadas, podendo ocorrer também pneumonia eosinofílica (Síndrome de Löeffler). Manifestações gastrointestinais incluindo dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos podem ocorrer de forma intermitente. Esses sinais clínicos são variáveis e muitas vezes se assemelham a outras doenças^{13;14}. A forma crônica da infecção, em geral, é assintomática, porém sintomas pulmonares e gastrointestinais podem também ocorrer. Nessa fase os pacientes podem permanecer infectados por longo período^{15;1}.

Formas graves, como hiperinfecção e doença disseminada, podem ocorrer em muitos indivíduos infectados. A hiperinfecção é caracterizada pelo grande número de formas do parasito nos sítios habituais, como pulmões e intestino delgado^{14;16}. Tem sido relatado que a hiperinfecção possa ser mais frequente em pacientes imunocomprometidos sobretudo aqueles que fazem uso de corticoesteróides^{17;1}. O uso de corticoesteróides e seus metabólitos exercem um efeito estimulatório direto sobre as larvas intra-intestinais acelerando suas mudas e favorecendo a auto-infecção ou ainda um efeito sobre a fêmea parasita levando ao aumento da ovoposição¹⁴. A hiperinfecção está atribuída a aceleração do processo de autoinfecção, e consequente exacerbação dos sinais e sintomas¹⁶.

A forma disseminada da doença ocorre quando as larvas migram para outros órgãos e sistemas não usuais, além do pulmonar e gastrointestinal, como esôfago, vesícula biliar, fígado, rins, diafragma, ovários, pâncreas, coração, musculatura esquelética, linfonodos, esôfago e encéfalo¹². O índice de mortalidade pode chegar a 87%, e esta comumente associada a infecção bacteriana secundária^{15;18}.

Os quadros de hiperinfecção e disseminação podem ser associados a terapias de imunossupressão induzida e doenças que afetam diretamente o sistema imunológico do indivíduo, como infecções por HTLV-1, gamaglobulinemias, transplantes, infecção pelo HIV e neoplasias malignas^{2;8;19}.

1.6 Resposta Imune

A resposta imunológica celular na estrogiloidíase é mediada por linfócitos T CD4+ com perfil Th2²⁰. Neste tipo de resposta, ocorre a liberação de interleucinas específicas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-21) envolvidas na sinalização celular em resposta a estimulação antigênica, visando controlar a infecção. Esses mecanismos de defesa atuam contra a larva filarioide e/ou sobre a fêmea parasita no intestino delgado^{21;1;20}. A imunidade adquirida tem um papel extremamente importante em pacientes com infecções crônicas. Os anticorpos IgA estão relacionados com a eliminação das larvas, e IgE atuam regulando a autoinfecção, enquanto que IgG4 podem atuar no bloqueio da ação da IgE²⁴. Grande parte dos portadores de estrogiloidíase desenvolvem anticorpos IgM, IgA, IgG, IgE específicos, sendo que anticorpos IgG estão correlacionados com a diminuição do número de fêmeas parasitos²².

Nos casos de pacientes infectados com *S. stercoralis*, a eosinofilia apresenta-se mais frequente quando comparada a outras infecções parasitárias intestinais, devido a presença das fêmeas parasitos na submucosa intestinal causando uma maior resposta inflamatória²³.

1.7 Diagnóstico da estrogiloidíase

1.7.1 Parasitológico

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase é baseado na visualização de formas do parasito, principalmente de larvas (L1/L2) ou (L3) na análise microscópica da amostra de fezes (Ash e Orihel, 1991)²⁴. No entanto, na maioria dos casos não complicados, a eliminação da larva é mínima e irregular, tendo uma baixa e intermitente liberação do parasito nas amostras fecais, dificultando o diagnóstico⁸. Os parasitos podem ser encontrados eventualmente em fluidos de aspirado duodenal, escarro, lavado brônquico,

urina, esfregaço de sangue periférico e líquido, ou até mesmo em biópsia de pele e de mucosa do aparelho digestório^{25;26}.

De um modo geral, os métodos parasitológicos possuem baixa sensibilidade, em torno de 30% quando uma única amostra de fezes é analisada, aumentando para 50% se forem analisadas três amostras, podendo chegar perto de 100% quando pelo menos sete amostras de fezes são analisadas em dias alternados²⁷. Devido à dificuldade de obtenção das sete amostras e inconveniência para o paciente, são frequentes um diagnóstico falso negativo na presença da infecção²⁸. Técnicas parasitológicas que tenham por fundamento o hidro e termotropismo positivo larvário como de Baermann²⁹ – Moraes⁷ ou de Rugai³⁰ apresentam bons resultados de sensibilidade, mas necessitam de material fresco e colhido em dias alternados³¹.

Com a finalidade de aumentar a possibilidade diagnóstica, são empregadas técnicas de coprocultura (cultura em placa de Ágar, cultura em papel-filtro e cultura de larvas em carvão) que apresentam boa sensibilidade quando comparadas as demais técnicas parasitológicas, pois promove o desenvolvimento no ciclo indireto do parasito, melhorando a visualização do parasito, porém exige um tempo maior para se obter resultados¹⁶. Arakaki et al.³² demonstraram que o método de cultura em placa de ágar para o diagnóstico de *S. stercoralis* aumenta entre duas a 4 vezes a eficácia no diagnóstico quando comparado com a técnica de Ritchie.

1.7.2 Sorológico

As técnicas imunológicas, principalmente as imunoenzimáticas, podem ser boas alternativas para o diagnóstico da estrogiloidíase, sobretudo nos casos de formas assintomáticas, com a finalidade de esclarecimento do diagnóstico clínico, em inquéritos soroepidemiológicos, e ao monitoramento de pacientes submetidos ao tratamento anti-

helmíntico³³. Entre elas pode-se citar a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), imunoenzimáticas (ELISA) e de Western-blot^{34;35}. Os testes imunoenzimáticos (ELISA) possuem alta praticidade e vêm sendo considerados superiores aos outros testes sorológicos, principalmente pela alta sensibilidade e especificidade³⁶, além de praticidade³⁷.

No entanto as maiores limitações dos testes sorológicos estão relacionadas com obtenção de quantidades suficientes do parasito *S. stercoralis* para a produção e fracionamento de antígenos³⁸, além da dificuldade de interpretação dos resultados, sobretudo a diferenciação entre casos recentes, crônicos e a manutenção da reatividade após o tratamento³⁹. Associa-se também as limitações da sorologia, não permitir estimar a carga parasitaria, e os frequentes relatos de resultados falso-positivos causadas pela reação cruzada com antígenos de outros nematódeos^{38; 40}.

1.7.3 Molecular

Enquanto os métodos parasitológicos permanecem como diagnóstico definitivo desta helmintíase, suplementado pelos métodos imunológicos, o uso dos métodos moleculares tem se apresentado promissores e aumentado nas duas últimas décadas⁴³.

O diagnóstico molecular, utilizando como ferramenta reação em cadeia da polimerase (PCR), tem-se mostrado bastante atrativo para detecção de parasitoses intestinais, principalmente pela alta sensibilidade e especificidade⁴². Associado à boa reprodutibilidade, potencial de desenvolvimento em larga escala, minimizando o tempo de diagnóstico^{43;44}. O material resultante da extração de DNA das amostras fecais permite fácil e prolongado armazenamento, possibilitando novas investigações^{45;46}. Com isso, as técnicas baseadas na detecção de DNA, podem ser alternativas para os problemas no diagnóstico da estrogiloidíase⁴⁷.

Embora o número crescente de publicações sobre a utilização da PCR, seja convencional ou em tempo real^{43;48;44;49}, ainda não há um consenso nos resultados, principalmente em relação a escolha de sequências alvos, o que dificulta a sua aplicação como métodos de escolha para o diagnóstico da estrogiloidíase. Diversos estudos realizados em modelos experimentais apresentam resultados promissores. Marra et al.⁵⁰ demonstraram maior sensibilidade da PCR comparada as técnicas parasitológicas convencionais durante infecções leves, sinalizando que a PCR possa ser uma alternativa útil para o diagnóstico da estrogiloidíase experimental. Resultados semelhantes também foram apontados por Paula et al.⁵¹, destacando a maior positividade da PCR em relação aos métodos parasitológicos na detecção de *S. venezuelensis*. O mesmo tem sido demonstrado no diagnóstico da estrogiloidíase humana. O estudo de Verweij et al.⁴³ foi o pioneiro em destacar o diagnóstico molecular no contexto da detecção da infecção de *S. stercoralis* em amostras fecais utilizando a PCR em tempo real. Recentemente, Paula et al.⁴⁹ destacaram a PCR para a detecção de DNA de *S. stercoralis* em amostras de fezes de pacientes infectados com HIV e HTLV-1.

De um modo geral, a identificação de parasitos por técnicas moleculares está relacionada com o sucesso na extração de DNA, no desenho apropriado das regiões alvos e na interpretação dos resultados^{45;41}. Os alvos, mais utilizados para o diagnóstico molecular de parasitos, são os genes ribossomais, principalmente pela presença em múltiplas cópias em todos os eucariotos⁴⁵. Entretanto nosso conhecimento sobre as sequências alvos para a identificação de *Strongyloides* ainda é limitado. Diversos estudos vêm demonstrando a utilização das regiões alvos gênero e 18S na infecção experimental para o diagnóstico molecular da *S. venezuelensis* com resultados promissores^{53;51;44;50;43}. Por outro lado, Krammer et al.⁴⁸ apontam a utilização do alvo 28S no diagnóstico molecular da estrogiloidíase humana e experimental. É importante destacar que além da alta sensibilidade das técnicas moleculares, a especificidade pode comprometer a sua

aplicação no contexto do diagnóstico da estrogiloidíase. Neste contexto, novos estudos se fazem necessários.

1.8 Modelo experimental

1.8.1 *Strongyloides venezuelensis*

S. venezuelensis e *Strongyloides ratti* são parasitos de roedores (*Rattus norvegicus*) comumente utilizados como modelo experimental, devido a sua facilidade de manutenção e manipulação em laboratório⁵⁵. Pode-se acrescentar que estas espécies não oferecem risco de infecção para seus manipuladores, e eliminam grande quantidade de ovos⁵⁴.

O Ciclo de vida de *S. venezuelensis* ocorre de forma semelhante a espécie que ocorre no homem (*S. stercoralis*). Inicia-se pela penetração ativa das larvas L3 na pele ou mucosa dos ratos ou camundongos, estas migram para o pulmão, a partir de 36 horas pós infecção, saem do órgão, passando gradualmente pela traqueia, esôfago e estomago até atingir o intestino delgado, entre 48 e 96 horas pós-infecção se instalam na porção inicial do duodeno, assim, desenvolvendo e se transformando em fêmeas adultas parasitos. O início da ovoposição ocorre após o 5º dia de infecção, sendo a maior fecundidade observada no 7º dia pós-infecção^{57;58}. Diferentemente da infecção por *S. stercoralis*, o hospedeiro infectado por *S. venezuelensis* não é observado o processo de autoinfecção, além da eliminação de ovos nas fezes⁵⁷.

Estudos utilizando modelos experimentais na estrogiloidíase tem auxiliado na padronização de novas técnicas diagnósticas⁵⁸, no entendimento da interação parasito-hospedeiro⁶¹ e em ensaios terapêuticos⁶⁰. A PCR tem sido avaliada como ferramenta para o diagnóstico molecular durante a infecção experimental^{50;51;48;52}. Krammer et al.⁴⁸ avaliando a infecção experimental com *S. ratti* demonstraram que a PCR em tempo real

pode ser uma ferramenta importante a ser utilizada na pesquisa de DNA específica na infecção por *Strongyloides*.

A infecção experimental com o parasito *S. venezuelensis* vem sendo utilizada em diferentes estudos para a avaliação de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares no contexto da estrongiloidíase^{52;61}. A PCR utilizando amostras fecais e de tecido de ratos infectados por *S. venezuelensis* tem sido proposta como ferramenta complementar ao diagnóstico dessa parasitose^{53;51}, mesmo frente a diferentes cargas parasitárias⁵⁰. Assim a utilização da PCR em modelos experimentais pode ser considerada uma importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico da estrongiloidíase humana, ocasionando resultados mais sensíveis e específicos. Com isso a análise de regiões do DNA ribossomal (rDNA) de *S. venezuelensis* pode contribuir para determinar um melhor alvo para ser aplicado ao diagnóstico molecular da estrongiloidíase.

2 JUSTIFICATIVA

Além da extração de DNA, a escolha de alvos, constituem processos fundamentais para a aplicação dos métodos moleculares no diagnóstico da *estrongiloidíase*. Cabe lembrar que o desempenho das técnicas moleculares tem sido heterogêneo nos estudos publicados até o momento^{44;62;43}, o que pode ser explicado pelas variações técnicas praticadas pelos grupos que as avaliaram. Assim novas avaliações moleculares, são urgentemente necessários.

Importante ressaltar que o nosso laboratório tem realizado estudos de avaliação do diagnóstico molecular no modelo experimental e na população humana^{44;51;51;52;61}, porém os resultados obtidos ainda são insatisfatórios para o emprego dessas metodologias na rotina laboratorial, principalmente em relação aos valores de especificidade. Outro ponto a ser ressaltado, que ainda não foi possível avaliar a infecção experimental considerando diferentes cargas parasitárias.

Assim deve-se priorizar estudos que avaliem as sequencias alvos empregadas, a fim de permitir uma maior confiabilidade e aplicação no diagnóstico molecular. Neste contexto a infecção experimental pode auxiliar consideravelmente na avaliação de alvos a serem utilizados no diagnóstico molecular da *estrongiloidíase*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar diferentes alvos do DNA ribossomal de *S. venezuelensis* para o diagnóstico molecular, ao longo da infecção experimental na presença de dois inóculos (400 e 4.000 L3).

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os produtos de PCR utilizando os diferentes alvos e o DNA das amostras de fezes ao longo da infecção experimental com *S. venezuelensis* na presença de dois inóculos (400 e 4.000 L3);
- Avaliar os resultados de sensibilidade e especificidade dos diferentes alvos para a detecção de DNA de *S. venezuelensis* ao longo da cinética experimental na presença de dois inóculos (400 e 4.000 L3).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IMT/SP, sob protocolo (CEUA-IMT 0357A), seguindo a normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos de coleta, manipulação de materiais biológicos e reagentes, além da utilização de equipamentos no laboratório, estiveram em conformidade com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al.⁶³.

4.2 Obtenção da larva infectante (L3) de *S. venezuelensis*

A cepa de *S. venezuelensis* utilizada, gentilmente foi cedida pela Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta (Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP), e tem sido mantida no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/SP) em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos e com 30 dias de idade, experimentalmente infectados (CEUA-IMT 0356A). Para tanto, as larvas infectantes (L3) foram obtidas a partir da cultura de fezes de *R. norvegicus* previamente infectados em carvão pelo método de Looss⁶⁴, durante 48 horas a 28°C. Após a cultura, as larvas recuperadas pelo método de Rugai³² foram lavadas em solução salina. O sedimento de larvas foi analisado em microscópio óptico, para a contagem das larvas L3, em seguida foi realizada a infecção dos animais com 2000 larvas L3 de *S. venezuelensis* para a manutenção da cepa.

Os animais receberam água e ração *ad libitum*. As gaiolas foram inspecionadas diariamente e limpas duas vezes por semana. A sala em que as gaiolas permaneceram depositadas estava equipada com exaustão de ar e dispositivo para promover alternância

de períodos claros e escuros a cada 12 horas. É válido destacar que os animais possuem laudo negativo para enteroparasitas intestinais.

4.3 Grupo experimental

Trinta (30) ratos (*R. norvegicus*, linhagem Wistar) machos e com 30 dias de idade, obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram mantidos em gaiolas apropriadas no biotério de Experimentação Animal do IMT/SP. Foram utilizados dois inóculos, 400 e 4.000 L3 de *S. venezuelensis* via subcutânea, formando dois grupos I e II, respectivamente, com 10 animais cada. Um grupo controle (com 10 animais) foi mantido sem infecção. Para a infecção, larvas L3 foram obtidas a partir de cultura das fezes de ratos infectados na manutenção da cepa de *S. Venezuelensis* (como descrito no item 4.2).

Durante 35 dias pós infecção (d.p.i.) foram analisadas diariamente as amostras de fezes dos animais infectados experimentalmente com *S. venezuelensis* nos dois grupos. Essas amostras foram utilizadas para a realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), e para a extração de DNA. Ao final da cinética experimental os animais foram submetidos à eutanásia pela administração por via intraperitoneal de tiopental pelo menos 3 vezes a dose anestésica (40mg/kg). Os animais dos grupos controle foram submetidos à eutanásia somente ao final do experimento, do mesmo modo do grupo experimental.

Todo procedimento seguiram as diretrizes do Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço da Saúde pautada na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 306 da ANVISA e na Norma regulamentadora – NR Nº 32.

4.4 Diagnóstico parasitológico

As amostras fecais colhidas diariamente foram utilizadas para monitorar a intensidade da infecção, pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de cada animal infectado, segundo o método descrito por Gordon, Whitlock⁶⁵.

Durante os 35 dias da cinética o material fecal foi coletado nos dois grupos de animais infectados com 400 e 4.000L3. Nos dias anteriores a coleta das fezes, os animais foram colocados em gaiolas sem maravalha para a coleta de todas as amostras de fezes. Foi realizado um pool contendo 0,2 gramas de 5 amostras de fezes de cada grupo de animais infectados, totalizando 1 grama de fezes. Este pool foi homogenizados em solução saturada de 14 mL de NaCl em cada dia da cinética experimental. Uma alíquota foi retirada e preenchida na câmara McMaster, permanecendo em repouso por 5 minutos. Em seguida foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) em microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão), em aumento de 10x. Para cada dia de infecção e em cada grupo foi realizada 5 contagens. Para cada resultado obtido o valor final foi multiplicado por 50.

4.5 Técnicas moleculares

4.5.1 Extração de DNA das amostra de fezes

Para extração do material genético das amostras fecais foi utilizado o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Uma etapa de lavagem inicial foi realizada, na qual aproximadamente 1 grama do material fecal foi homogenizado em tampão salino fosfato (PBS) 1x concentrado, acrescido de solução de Polivinilpolipirrolidona 2%. O microtubo foi aquecido a 100°C durante dez minutos em banho maria a seco, centrifugado durante um minuto a 14.000 rpm e o sobrenadante desprezado. No sedimento proveniente da etapa inicial de lavagem, foi

adicionado tampão ASL (1,4mL). Esta mistura foi homogeneizada por quinze segundos e incubada à 70°C em banho maria a seco por cinco minutos. Em seguida, homogeneizada por quinze segundos e centrifugada por um minuto a 14.000 rpm. Foi adicionado o sobrenadante (1,2 mL) em um novo micro-tubo contendo um tablete de Inhibitex®, em seguida a amostra foi homogeneizada por um minuto, incubada em temperatura ambiente por um minuto e centrifugada por três minutos a 14.000 rpm. Em um novo tubo contendo 15 µL da enzima Proteinase K, foi adicionado 200 µL do sobrenadante, homogeneizado por quinze segundos, e incubado em banho maria a seco a 56°C por duas horas.

Findo esse período, foi adicionado tampão AL (200 µL) no microtubo e homogeneizado novamente por quinze segundos. Esta mistura foi incubada por dez minutos a 70 °C. Após este período foi adicionado etanol absoluto (200 µL) e homogeneizado rapidamente. Todo conteúdo foi transferido para uma coluna acoplada em um tubo coletor, sendo centrifugada por um minuto a 14.000 rpm. O tubo coletor contendo filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo, seguida pela adição de tampão AW1 (500 µL) e centrifugação por um minuto a 14.000 rpm. Em seguida, a coluna foi transferida novamente para um novo tubo, seguida pela adição de tampão AW2 (500 µL) e centrifugação por três minutos a 14.000 rpm. O tubo coletor contendo filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo micro-tubo de 1,5 mL, foi adicionado tampão AE (50 µL) na coluna e incubada por um minuto em temperatura ambiente (TA). Após incubação, o micro-tubo foi centrifugado por um minuto a 14.000 rpm. Novamente, foi adicionado tampão AE (50 µL) na coluna e incubada por um minuto em temperatura ambiente (TA). Após incubação, o micro-tubo foi centrifugado por um minuto a 14.000 rpm, e a coluna descartada. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer v.3.2.1 (NanoDrop Technologies Scientific, Wilmington, Delaware USA). A estimativa de pureza foi dada pela relação da absorbância do DNA/proteína⁶⁶. O DNA obtido foi dividido em alíquotas e armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.5.2 Extração de DNA de outros parasitos

O DNA de vermes adultos de *Toxocara canis*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni* e cultura positiva de *Blastocystis* sp. foram utilizados como controle de especificidade dos alvos. Foi utilizado estes parasitas por conveniência de manutenção no nosso laboratório.

O DNA foi obtido utilizando kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®- Hilden, Germany), seguindo instruções do fabricante com pequenas modificações. Foi adicionado 180µl de Buffer ATL em 200µl da amostra em microtubo. Em seguida houve adição de 20µl de proteinase K, homogeneização e incubação por 2 horas a 56°C. Findo esse período foi adicionado 200µl do tampão AL, seguido por homogeneização e incubação em banho seco por 10 minutos a 70°C. Após adicionar 200µL de etanol gelado absoluto, o material foi homogeneizado por 15 segundos. A amostra foi adicionada a uma coluna acoplada em um tubo coletor, sendo então centrifugada por 1 minuto a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado, e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. Foi adicionado 500µl do tampão AW1 a coluna, seguida por centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O tubo coletor foi trocado, e adicionado 500µl do tampão AW2 seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. O filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor identificado e adicionado 50 µL do tampão AE e centrifugado por 1 min a 8.000 rpm. Foi adicionado novamente 50µL do tampão AE, centrifugado durante 1 minuto a 14.000 rpm, e o DNA eluido foi armazenado a -20°C.

4.5.3 Alvos

Foram avaliadas diferentes regiões do rDNA de *Strongyloides* (Tabela 2). Dois alvos presente na subunidade 18S: as posições 42-407 (~340bp), denominada de “alvo gênero (Gen)”; e as posições 1530-1636 (~101bp), chamada de “alvo 18S”; e um alvo presente na subunidade 28S, na posição 2608-2789 (~181bp) denominada de “alvo 28S”.

Tabela 2 – Alvos para reação da PCR da detecção de DNA de *S. venezuelensis* nas amostras fecais de ratos experimentalmente infectados.

Alvos	Sequências	Pares de Bases (pb)	Ref.
Gen	F: 5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3' R: 5'-GCCTGCTGCCTTTGGA-3'	~340bp	Dorris et al. ⁶⁷
18S	F: 5'-GAATTCCAAGTAACCGTAAGTCATTAGC-3' F: 5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3'	~101bp	Verweij et al. ⁴³
28S	F: 5'-TTAGAGTCGTGTTGGTTGGAA-3' F: 5'-GTGCAAGTGGCTCTGTATGC-3'	~181bp	Krammer et al. ⁴⁸

F, “forward”; R, “reverse”

4.5.4 Reação da cadeia em polimerase (PCR)

A reação foi realizada em volume final de 10 µL, sendo DNA (~50 ng/µL) e 6 µL de mix contendo: água de injeção (2,8 µL), tampão 1x PCR (1,0 µL), dNTPs (0.2 mM), MgCl₂ (1.5mM) e cada região alvo (*forward e reverse*) (20 pmol/ µL) e de *Platinum® Taq DNA polimerase* (0,1 µL, 5U/µL, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA). Os ciclos de amplificação para os alvos foram de 94°C por dois minutos para desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 94 °C por um minuto (desnaturação), 60 °C por um minuto (anelamento) e 72 °C por um minuto (extensão), e extensão final de 72 °C por dois minutos. A reação foi realizada no equipamento Master cycler ep gradient S thermocycler (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha).

Um controle positivo (DNA de larvas L3 de *S. venezuelensis*) e um controle negativo (mix da reação de PCR e água destilada) foram utilizados em cada reação.

4.5.5 Eletroforese

A identificação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de

agarose com a adição de corante *SYBR safe* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA). Foram misturados 5 µL do produto amplificado com 1 µL do tampão 10X *Bluejuice™ Gel Loading Buffer* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA), a mistura foi aplicada em um gel de agarose 2% preparado com tampão TBE 1X e 7 µL de corante *SYBR safe* para cada 70 mL de tampão. Foram acrescentados aos géis marcadores de 50 e 100 pares de bases (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA) para avaliação do tamanho do fragmento obtido, um controle positivo e um controle negativo. A eletroforese ocorreu sob tensão elétrica de 110 volts e corrente elétrica de 400mA por 60 minutos.

Após o término da eletroforese, os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA) e fotografado para posterior análise.

4.5.6 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com base na metodologia de Sanger⁷⁰ utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA). A concentração de DNA utilizada nas reações de sequenciamento foi determinada de acordo com o tamanho do produto de PCR e seguindo as orientações do kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA).

Os produtos gerados no ciclo da PCR foram inicialmente purificados utilizando a enzima EXOSAP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) conforme instruções do fabricante. Após a purificação, foram submetidos a reação de sequenciamento para

incorporação dos dNTPs marcados. A reação foi realizada em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA). Para reação de sequenciamento foram utilizados 4 μ L do reagente Ready Reaction Premix (kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA); 2 μ L do tampão 5X (20 Tris 1 M pH 9,0 + 50 mM de MgCL₂); 2 μ L de cada alvo (1,6 pmol/ μ L); 2 μ L do produto purificado e 10 μ L de água Mili-Q com volume final de reação de 20 μ L. As condições da PCR foram: 40 ciclos de 95 °C por dois minutos; 96 °C por trinta segundos; 52 °C por trinta segundos seguido de 60 °C por quatro minutos para extensão final. O produto final foi precipitado adicionando 65 μ L de solução (EDTA 125 Mm e etanol absoluto), seguido por incubação em temperatura ambiente por 15 minutos.

Após o período de incubação, o material foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, ao pellet restante foi adicionado 60 μ L de etanol 70% seguido por centrifugação a 14.000 rpm por quinze minutos. Em seguida, foi adicionado ao pellet 10 μ L de formamida e incubado a 95 °C. O produto foi resfriado em banho de gelo e submetido ao sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA).

4.5.7 Análise molecular

As sequências geradas foram avaliadas quanto a sua qualidade pelo programa *Eletropherogram quality analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Para confirmar a amplificação de DNA de *S. venezuelensis*, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências de *Strongyloides* sp. presentes nos bancos de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2>), utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

4.6 Análise dos dados

Todos os dados gerados foram inseridos no programa Office Excel, e as análises descritivas foram realizadas de acordo com a natureza das variáveis. Os resultados foram apresentados em forma gráfica para melhor interpretação das informações utilizando o programa *GraphPad Prism* 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 Diagnóstico parasitológico

Para realizar a estimativa da cinética experimental da infecção foi realizada a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG). O gráfico 1 representa a variação da contagem de ovos ao longo da cinética experimental. Com relação ao inóculo de 400 larvas L3, pode-se observar que o início da eliminação de ovos ocorreu no 5º d.p.i., seguido por um pico de alta eliminação no 8º d.p.i. e com último dia de eliminação de ovos ao 33º d.p.i. Por outro lado, no inóculo de 4.000 larvas L3 o início da eliminação de ovos ocorreu no 5º d.p.i., seguido por um pico de alta eliminação no 8º d.p.i. e no 34º d.p.i como último dia de eliminação de ovos. Devemos ressaltar a ocorrência de outros dias que apresentaram eliminação significativa de ovos, sendo o 10º e 21º d.p.i no inóculo de 400 larvas L3; e o 10º, 21º e 23º d.p.i. no inóculo de 4.000 larvas L3.

Gráfico 1 – Contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais experimentalmente com 400 e 4.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Os valores representam a média do número de ovos liberados durante os 35 d.p.i. (dias pós infecção).

Na tabela 3 está demonstrado o número médio de ovos por grama de fezes ao longo da cinética experimental, considerando as cinco contagens. O período de maior eliminação de ovos ocorreu no 8º d.p.i. em ambos os inóculos com $14.600 \pm 1.702,9$ (400L3) e $43.870 \pm 4.801,5$ (4.000L3). Além disso, outros picos menores foram observados no 10º d.p.i. ($9.190 \pm 823,0$) e 21º d.p.i. ($600 \pm 158,1$) nos animais com 400 larvas L3, enquanto que nos animais com 4.000 larvas L3 foram observados no 10º d.p.i. ($28.056 \pm 3.126,8$), 21º d.p.i. ($5.350 \pm 1.621,3$) e 23º d.p.i. ($8.360 \pm 571,6$).

Tabela 3 – Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de animais infectados experimentalmente com 400 e 4.000 larvas filarioide de *S. venezuelensis*. Os valores estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão, considerando as cinco contagens em cada dia pós infecção (d.p.i.).

d.p.i.	OPG	
	400L3	4.000L3
1 ^o	0	0
2 ^o	0	0
3 ^o	0	0
4 ^o	0	0
5 ^o	150 $\pm$ 127,4	250 $\pm$ 258,8
6 ^o	2.494 $\pm$ 375,1	8.100 $\pm$ 821,6
7 ^o	5.480 $\pm$ 975,7	27.300 $\pm$ 5.674,5
8 ^o	14.600 $\pm$ 1.702,9	43.870 $\pm$ 4.801,5
9 ^o	5.688 $\pm$ 1.044,4	21.650 $\pm$ 3.300,4
10 ^o	9.190 $\pm$ 823,0	28.056 $\pm$ 3.126,8
11 ^o	5.934 $\pm$ 795,5	27.020 $\pm$ 6.765,2
12 ^o	2.580 $\pm$ 472,5	15.330 $\pm$ 3.391,6
13 ^o	2.080 $\pm$ 185,3	11.320 $\pm$ 4.542,7
14 ^o	1.442 $\pm$ 362,5	8.500 $\pm$ 2.222,9
15 ^o	1.240 $\pm$ 271,0	5.038 $\pm$ 1.211,3
16 ^o	954 $\pm$ 167,6	3.180 $\pm$ 309,4
17 ^o	740 $\pm$ 119,4	2.880 $\pm$ 160,5
18 ^o	700 $\pm$ 79,1	2.490 $\pm$ 119,4
19 ^o	420 $\pm$ 75,8	1.540 $\pm$ 174,6
20 ^o	220 $\pm$ 57,0	2.580 $\pm$ 211,0
21 ^o	600 $\pm$ 158,1	5.350 $\pm$ 1.621,3
22 ^o	500 $\pm$ 145,8	3.540 $\pm$ 550,5
23 ^o	700 $\pm$ 231,8	8.360 $\pm$ 571,6
24 ^o	730 $\pm$ 201,9	4.160 $\pm$ 487,9
25 ^o	660 $\pm$ 178,2	3.180 $\pm$ 301,2
26 ^o	490 $\pm$ 129,4	1.630 $\pm$ 284,2
27 ^o	280 $\pm$ 135,1	1.090 $\pm$ 216,2
28 ^o	220 $\pm$ 57,0	590 $\pm$ 191,7
29 ^o	50 $\pm$ 35,4	40 $\pm$ 41,8
30 ^o	50 $\pm$ 61,2	40 $\pm$ 22,4
31 ^o	20 $\pm$ 27,4	20 $\pm$ 27,40
32 ^o	10 $\pm$ 22,4	10 $\pm$ 22,4
33 ^o	30 $\pm$ 27,4	30 $\pm$ 27,4
34 ^o	0	20 $\pm$ 27,40
35 ^o	0	0

5.2 Diagnóstico molecular de *S. venezuelensis*

5.2.1 Análise das regiões alvos

Para análise da efetividade dos alvos foram utilizadas amostras de DNA controles positivos, provenientes de larvas filarioides (L3); e negativos, de animais não infectados (Figura 3). Não houve amplificação dos alvos utilizando o DNA obtido das amostras de fezes dos animais negativos.

Figura 3 – Amplificação de DNA utilizando os diferentes iniciadores da subunidade ribossomal de *Strongyloides*. A= alvo Gen (340bp). B= alvo 18S (101bp). C= alvo 28S (181bp). CP: controle positivo (DNA obtido de larvas filarioides de *S. venezuelensis*). CN: controle negativo (DNA obtido de amostras de fezes de animais não infectados). PM: Padrão de peso molecular 100bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Quanto à sensibilidade analítica da PCR foram realizadas diluições seriadas na base 10 de DNA, utilizando amostra de DNA ($\sim 2\text{ng}/\mu\text{L}$) obtido de larvas L3, para as três regiões alvos (Figura 4). Pode-se observar que o alvo 28S apresentou maior sensibilidade, com amplificação do DNA alvo até a concentração de $2 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Figura 4 - Amplificação de DNA, proveniente de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, utilizando os alvos, A= Gen (~340bp), B= 18S (~101bp), C= 28S (~181bp) para teste da sensibilidade da PCR em diferentes diluições do DNA. PM (padrão de peso molecular 100bp - Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Para avaliar a especificidade foram utilizadas amostras de DNA obtidas de fezes de animais negativos, vermes adultos de *H. diminuta*, *T. canis* e *S. mansoni*, e cultura de *Blastocystis* sp. (Figura 5). Pode-se verificar amplificação inespecífica principalmente com DNA obtido de *S. mansoni*, considerando o alvo gênero.

Figura 5 - Amplificações de DNA utilizando os diferentes alvos da subunidade ribossomal de *Strongyloides* para teste de especificidade. Alvo Gen (340bp). Alvo18S (101bp). Alvo 28S (181bp). CP= controle positivo (DNA obtidas de larvas filarioide (L3) de *S. venezuelensis*). CN= controle negativo (DNA obtidas de amostras de fezes de animais não infectados). Foram testadas amostras de *Hymenolepis diminuta* (Hy), *Toxocara canis* (To) *Blastocystis sp* (Bl) e de *Schistosoma mansoni* (Sc). PM= Padrão de peso molecular 100bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA) e 50bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

5.2.2 Avaliações das técnicas moleculares

5.2.2.1 Picos selecionados na cinética experimental

Num primeiro momento foi realizada a extração de DNA amostras de fezes, baseando-se na cinética de eliminação de ovos. Assim, foram utilizadas as amostras dos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º d.p.i. para a extração de DNA, seguida pela PCR, considerando três alvos (Figura 5, 6 e 7).

Figura 6 - Amplificação de DNA, utilizando o alvo Gen (340bp), a partir de amostras de DNA obtido de larva de fezes de animais infectados no 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção nos inoculos 400 e 4.000L3. PM (Padrão de peso molecular 100bp) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Figura 7 - Amplificação de DNA, utilizando o alvo 18S (~101bp), a partir de amostras de DNA obtido de larva de fezes de animais infectados no 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção nos inoculos 400 e 4.000L3. PM (Padrão de peso molecular 50bp) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Figura 8 - Amplificação de DNA, utilizando o alvo 28S (181bp), a partir de amostras de DNA obtido de larva de fezes de animais infectados no 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção nos inoculos 400 e 4.000L3. PM, Padrão de peso molecular 50bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Baseando-se nos produtos da PCR foi possível verificar que não houve amplificação de todos os alvos nos dias selecionados. Pode-se observar que as PCR-18S e PCR-28S apresentaram amplificação nos dias 5, 8, 11, 15, 23 e 35 d.p.i. (Tabela 4).

Tabela 4 – Amplificação dos alvos utilizando os alvos Gen, 28S e 18S, ao longo da cinética experimental dos animais infectados com 400 e 4.000 larvas filarioide de *S. venezuelensis*.

d.p.i.	OPG		400L3			4.000L3		
	400L3	4.000L3	Gen	18S	28S	Gen	18S	28S
2º	0	0	-	-	-	-	-	+
5º	150	250	+	+	+	-	+	+
8º	14.600	43.870	+	+	+	+	+	+
11º	5.934	27.020	+	+	+	+	+	+
15º	1.240	5.038	+	+	+	+	+	+
23º	700	8.360	-	+	+	-	+	+
35º	0	0	-	+	+	-	+	+

- não houve amplificação, + com amplificação do alvo

5.2.2.2 Cinética experimental completa

A partir destes resultados foi realizada uma nova extração de DNA e avaliado as regiões alvos (Gen, 18S e 28S) em todos os dias da cinética experimental, em ambos os inóculos. Nas amostras de DNA sem amplificação foi realizada a PCR em triplicata. Os resultados estão apresentados seguindo uma escala de intensidade de marcação das bandas (forte e fraca) como demonstrado no gel de agarose (Figura 9).

Figura 9 - Amplificação de DNA, utilizando os alvos Gen (~340bp), 28S (~181bp) e 18S (~101bp) a partir de amostras de DNA obtido de larva de *S. venezuelensis*. Considerando 1, 3 e 5 (banda forte), 2, 4 e 6 (banda fraca). PM, Padrão de peso molecular 50bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA).

Nos Quadros (1 e 2) e Gráfico 2 estão representados os resultados da amplificação das bandas alvos, utilizando os alvos (Gen, 18S e 28S) e considerando a intensidade de visualização das bandas no gel de agarose.

Quadro 1: Intensidade de visualização das bandas alvos no gel de agarose utilizando os três iniciadores (Gen, 18S e 28S) em relação a positividade da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) obtido das amostras dos animais infectados com 400L3, ao longo da cinética experimental.

d.p.i.	Parasitológico	Molecular		
	OPG	PCR-Gen	PCR-18S	PCR-28S
1°	-	-	-	+
2°	-	-	-	+
3°	-	-	-	+
4°	-	-	-	+
5°	+	-	+	+
6°	+	+	+	+
7°	+	+	+	-
8°	+	+	+	+
9°	+	+	+	+
10°	+	+	+	+
11°	+	+	+	+
12°	+	+	+	-
13°	+	+	+	+
14°	+	+	+	+
15°	+	+	+	+
16°	+	+	+	+
17°	+	-	+	+
18°	+	+	+	+
19°	+	+	+	-
20°	+	+	+	+
21°	+	+	+	+
22°	+	+	-	-
23°	+	+	+	+
24°	+	+	+	+
25°	+	+	+	-
26°	+	+	+	+
27°	+	-	+	+
28°	+	-	+	+
29°	+	+	+	+
30°	+	-	+	+
31°	+	-	-	+
32°	+	-	-	-
33°	+	-	-	+
34°	-	-	-	+
35°	-	-	-	-

Fraca
Forte

+ resultado positivo, - resultado negativo, * bandas inespecíficas (abaixo ou acima da alvo)

Quadro 2: Intensidade de visualização das bandas alvos no gel de agarose utilizando os três iniciadores (Gen, 18S e 28S) em relação a positividade da contagem de ovos por gramas de fezes obtido das amostras dos animais infectados com 4.000L3, ao longo da cinética experimental.

d.p.i.	Parasitológico	Molecular		
	OPG	PCR-Gen	PCR-18S	PCR-28S
1°	-	-	-	+
2°	-	-	-	+
3°	-	-	-	+
4°	-	- *	-	+
5°	+	-	+	+
6°	+	+	+	+
7°	+	+	+	+
8°	+	+	+	+
9°	+	+	+	+
10°	+	+	+	+
11°	+	+	+	+
12°	+	+	+	+
13°	+	+	+	+
14°	+	+	+	+
15°	+	+	+	+
16°	+	+	+	+
17°	+	-	+	+
18°	+	+	+	+
19°	+	+	+	+
20°	+	+	+	+
21°	+	+	+	+
22°	+	-	+	+
23°	+	+	+	+
24°	+	+	+	+
25°	+	+	+	+
26°	+	+	+	+
27°	+	+	+	+
28°	+	+	+	+
29°	+	+	+	+
30°	+	+	+	+
31°	+	+	+	+
32°	+	+	-	+
33°	+	+	-	+
34°	-	+	-	+
35°	-	+	-	+

Fraca
Forte

+ resultado positivo, - resultado negativo, * fragmentos inespecíficos (abaixo ou acima da alvo)

Pode-se observar que a amplificação dos alvos ocorreu em maior ou menor intensidade, independente do inóculo e do dia pós-infecção. Observando a PCR-Gen à amplificação ocorreu até o 29º d.p.i. e 35º d.p.i. nos animais do grupo 400L3 e 4.000L3, respectivamente. É válido ressaltar que houve amplificação de bandas inespecíficas (aproximadamente 300, 400 e 500bp) em muitas amostras independente do inóculo e do dia pós-infecção. Considerando a PCR-18S, a amplificação do alvo ocorreu até o 30º d.p.i. e 31º d.p.i. nos grupos 400L3 e 4.000L3, respectivamente. Por outro lado, a PCR-28S à amplificação iniciou no 1º d.p.i. nos dois inóculos, com alguns dias sem amplificação nos animais do grupo 400L3.

Gráfico 2: Representação da intensidade de visualização das bandas no gel de agarose nos dois grupos (400L3, 4.000L3) utilizando os três alvos (Gen, 18S e 28S), em relação aos dias pós-infecção. Considerando no eixo da intensidade de marcação o número 0 (sem amplificação), 1 (fraca) e 2 (forte).

A intensidade de visualização dos produtos de PCR no gel de agarose, considerando os alvos (Gen, 18S e 28S) foi variada, sobretudo com maior intensidade da banda no inoculo de 4.000L3.

5.3 Sequenciamento

Os produtos de PCR provenientes dos dias selecionados (segundo a tabela 4) foram submetidas ao sequenciamento para confirmar a amplificação específica de DNA de *S. venezuelensis*. Em seguida foi avaliada a qualidade das sequencias obtidas. Pode-se observar que as sequencias obtidas da PCR-28S apresentaram maior qualidade (gráfico 3).

Gráfico 3: Qualidade das sequências obtidas utilizando os três alvos (Gen, 18S, 28S) nos dois grupos (400L3 e 4.000L3) ao longo da cinética experimental. Considerando o valor de qualidade >30% segundo o programa *Electropherogram quality analysis*.

Nos quadros 3, 4 e 5, estão apresentados a identidade das sequências obtidas com as depositadas na base de dados, considerando a PCR-Gen, PCR-18S e PCR-28S, respectivamente.

Quadro 3: Similaridade com as sequências depositadas na base de dados dos produtos da PCR-Gen a partir do DNA obtidos nos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.) dos animais infectados com 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*.

d.p.i.	400L3			4.000L3		
	% Identidade	~ (pb)	Descrição	% Identidade	~ (pb)	Descrição
2º	SA	-	-	87 a 89	420 ^{F/R}	<i>Triticium aestivum</i> , <i>Penalis vannamei</i>
5º	91 a 93	1024 ^F	<i>Strongyloides</i> sp	SA	-	-
8º	SR	-	-	98 a 99	360 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
11º	97 a 100 91	360 ^C	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp	94	370 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
15º	97,7 a 98,5	1019 ^F	<i>Strongyloides</i> sp	100	360 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
23º	SA	-	-	SA	-	-
35º	SA	-	-	SA	-	-

SA = sem amplificação, SR = sequência ruim, ~ tamanho aproximado (pb), C = com formação de “contig”, F/R = recuperação da sequências “forward” e/ou “reverse”

Quadro 4: Similaridade com as sequências depositadas na base de dados dos produtos da PCR-18S a partir do DNA obtidos nos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.) dos animais infectados com 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*.

d.p.i.	400L3			4.000L3		
	% Identidade	~(pb)	Descrição	% Identidade	~(pb)	Descrição
2º	SA	-	-	95	76 ^R	<i>Strongyloides</i> sp
5º	93,3 a 95,4	81 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp	95,5 a 97,0	74 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp
8º	94,2 a 98,3	84 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp	95,5 a 97 93	80 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp
11º	95,5 a 100 93	83 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp	93 a 100 92	75 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp
15º	93,4 a 100%	82 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp	92 a 100	78 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp
23º	100	142 ^R	<i>S. stercoralis</i> , <i>Blastocystis</i> sp	96 a 100 92 90	82 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp <i>Blastocystis</i> sp
35º	95 a 100 92,8	74 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp	97 a 100 95	87 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp <i>Alloionema</i> sp

SA = sem amplificação, SR = sequência ruim, ~ tamanho aproximado (pb), C = com formação de “contig”, F/R = recuperação da sequências “forward” e/ou “reverse”

Quadro 5: Similaridade com as sequências depositadas na base de dados dos produtos de PCR-28S a partir do DNA obtidos nos 2º, 5º, 8º, 11º, 15º, 23º e 35º dias pós-infecção (d.p.i.) dos animais infectados com 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*.

d.p.i.	400L3			4.000L3		
	% Identidade	~(pb)	Descrição	% Identidade	~(pb)	Descrição
2º	SA	-	-	95 a 97	155 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp
5º	99 a 100	178 ^C	<i>Strongyloides</i> sp	SR	-	-
8º	99 a 100	178 ^C	<i>Strongyloides</i> sp	99 a 100	178 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
11º	99 a 100	179 ^C	<i>Strongyloides</i> sp	99 a 100	178 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
15º	97 a 98	156 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp	99 a 100	179 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
23º	95 a 98	155 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp	100	179 ^C	<i>Strongyloides</i> sp
35º	99 a 100	178 ^C	<i>Strongyloides</i> sp	95 a 97	87 ^{F/R}	<i>Strongyloides</i> sp

SA = sem amplificação, SR = sequência ruim, ~ tamanho aproximado (pb), C = com formação de “contig”, F/R = recuperação da sequências “forward” e/ou “reverse”

Pode-se observar que o alvo gênero, ocorreu amplificação no 2º d.p.i. nas amostras dos animais com 400L3, no entanto, não houve similaridade na base de dados com as sequências de *Strongyloides* sp. Por outro lado, os alvos 18S e 28S apresentaram similaridade no 2º d.p.i. somente no grupo 4.000L3, porém sem formação de *contig*.

5.4 Comparação das técnicas parasitológica (OPG) e PCR (Gen, 18S e 28S)

No quadro 6 está demonstrado a comparação entre os resultados obtidos com a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) e os diferentes alvos, nos dois inóculos 400L3 e 4.000L3 ao longo da cinética experimental. Considerando o resultado da OPG como 100% de positividade em cada inóculo, pode-se observar que a sensibilidade de cada alvo foi variada. No grupo 400L3, a OPG foi positiva em 29 amostras (5º ao 33º d.p.i.), enquanto que PCR utilizando os alvos detectaram 21/29 (72,4%), 25/29 (86,2%), e 23/29 (79,3%), Gen, 18S e 28S, respectivamente. Por outro lado, no grupo 4.000L3, a OPG foi positiva em 30 amostras (5º ao 34º d.p.i.), destas 27/30 (90%) apresentaram o fragmento alvo pelas PCR-Gen e PCR-18S, e todas (100%) o fragmento alvo para a PCR-28S.

Quadro 6: Comparação dos resultados da contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) e dos testes moleculares (Gen, 18S e 28S) considerando os dois grupos de animais (400L3 e 4.000L3), ao longo da cinética experimental.

d.p.i.	400L3				4.000L3			
	OPG	PCR-Gen	PCR-18S	PCR-28S	OPG	PCR-Gen	PCR-18S	PCR-28S
1°	-	-	-	+	-	-	-	+
2°	-	-	-	+	-	-	-	+
3°	-	-	-	+	-	-	-	+
4°	-	-	-	+	-	-	-	+
5°	+	+	+	+	+	-	+	+
6°	+	+	+	+	+	+	+	+
7°	+	+	+	-	+	+	+	+
8°	+	+	+	+	+	+	+	+
9°	+	+	+	+	+	+	+	+
10°	+	+	+	+	+	+	+	+
11°	+	+	+	+	+	+	+	+
12°	+	+	+	-	+	+	+	+
13°	+	+	+	+	+	+	+	+
14°	+	+	+	+	+	+	+	+
15°	+	+	+	+	+	+	+	+
16°	+	+	+	+	+	+	+	+
17°	+	-	+	+	+	-	+	+
18°	+	+	+	+	+	+	+	+
19°	+	+	+	-	+	+	+	+
20°	+	+	+	+	+	+	+	+
21°	+	-	+	+	+	+	+	+
22°	+	+	-	-	+	-	+	+
23°	+	+	+	+	+	+	+	+
24°	+	+	+	+	+	+	+	+
25°	+	+	+	-	+	+	+	+
26°	+	+	+	+	+	+	+	+
27°	+	-	+	+	+	+	+	+
28°	+	-	+	+	+	+	+	+
29°	+	+	+	+	+	+	+	+
30°	+	-	+	+	+	+	+	+
31°	+	-	-	+	+	+	+	+
32°	+	-	-	-	+	+	-	+
33°	+	-	-	+	+	+	-	+
34°	-	-	-	+	+	+	-	+
35°	-	-	-	+	-	-	-	+

+ resultado positivo, - resultado negativo

Na comparação entre os alvos pode-se observar que existe uma grande concordância entre os resultados, ou seja, uma amostra de DNA positiva em um alvo foi também positiva nos outros. Isto ficou mais evidente nos dias pós-infecção com maior eliminação de ovos, independente no inoculo. Fica demarcada a maior sensibilidade da PCR-28S com amplificação do alvo no início da infecção, em contrapartida a menor especificidade da PCR-Gen, facilmente observado pela amplificação de bandas inespecíficas.

6 DISCUSSÃO

A estrogiloidíase é uma doença tropical negligenciada com prevalência em vários países, sendo responsável por infecções crônicas assintomáticas em pacientes imunocompetentes e imunocomprometido, além de ter assumido importância médica pelo crescente número de óbitos principalmente nos indivíduos acometidos³³. O diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* por métodos parasitológicos convencionais é dificultado pela intermitência na excreção da larva, assim a combinação de métodos se faz necessária⁵³. Com este intuito, alguns estudos avaliaram a combinação de métodos parasitológicos e moleculares em modelos experimentais para aprimorar o conhecimento quanto a dinâmica da estrogiloidíase^{53;44; 51; 52}.

No presente estudo a cinética de eliminação de ovos demarcou consideravelmente a infecção experimental, deixando marcada as fases aguda e crônica, com maior e menor eliminação de ovos, respectivamente. Quando observado o inóculo de 400 larvas L3, o início da eliminação do número de ovos ocorreu no 5º d.p.i., seguido por um pico máximo que ocorreu no 8º d.p.i. e pela redução a partir do 33º d.p.i. Quanto ao inóculo de 4.000 larvas L3 pode-se observar um padrão similar de eliminação de ovos, apenas com uma diferença em que a redução ocorreu no 34º d.p.i. Vale ressaltar que em ambos os inóculos pode-se observar a presença de picos menores de eliminação de ovos, sendo no 10º d.p.i. (400L3) e 21º e 23º d.p.i. (4.000L3). O inóculo de 4.000 larvas L3 apresentou um tempo maior de eliminação de ovos, além de picos menores significativos na cinética experimental.

A ocorrência de mais de um pico na cinética experimental foi descrita em outros estudos experimentais utilizando ratos *R. norvegicus* da linhagem Wistar. Dentre estes, Kimura et al.⁷¹ demonstraram dois picos de eliminação de ovos no 7º-8º e no 11º d.p.i., em animais infectados com *S. ratti*. Marques et al.⁵⁴ utilizando animais infectados com 2.000

L3 de *S. venezuelensis*, observaram três picos de eliminação de ovos sendo o maior deles no 8º d.p.i. (~33.267 OPG) e dois menores, no 13º d.p.i. (~19.792 OPG) e no 21º d.p.i. (~8.117 OPG). Além disso, Nakai e Amarante⁷⁰ avaliando a infecção 500 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*, observaram 3 picos, sendo o maior deles no 8º d.p.i. (~96.900 OPG) e dois menores, no 11º d.p.i. (~60.000 OPG) e no 21º d.p.i. (~35.000 OPG). Por outro lado, Silveira et al.⁷¹ verificou um pico no 7º d.p.i. (17.000 OPG) em animais infectados com 1.500 L3 de *S. venezuelensis*. A presença de outros picos de elevação de OPG pode ser devido a presença de fêmeas que se estabelecem no intestino grosso⁷⁰. É válido ressaltar que a variação na eliminação de ovos em cada estudo realizado, podem ser devido ao trânsito do alimento e das fezes no trato gastrointestinal, bem como a consistência das mesmas, ou ainda a distribuição de ovos nas amostras fecais nos animais⁷². Acrescenta-se que embora as espécies dentro do gênero *Strongyloides* apresentem semelhanças em modelo experimentais pequenas variações ocorrem⁷⁰, sobretudo baseando-se no inóculo utilizado para realizar a infecção experimental.

Na busca de técnicas diagnósticas mais efetivas, a biologia molecular torna-se uma ferramenta promissora. O uso da PCR para o diagnóstico de helmintos em amostras fecais tem demonstrado maior sensibilidade que as técnicas parasitológicas convencionais^{43;74}. No contexto da estrogiloidíase alguns estudos avaliaram a utilização da PCR no diagnóstico molecular, tanto em amostras de fezes humanas quanto de animais experimentais. Sitta et al.⁴⁴ relataram que o alvo espécie-específico (18S) apresenta boa sensibilidade na detecção de DNA de *S. stercoralis* em fezes humanas. Marra et al.⁵⁰ relatou que a PCR utilizando o alvo Gen pode ser uma metodologia com alta sensibilidade em fezes de ratos infectados com baixa carga parasitaria. Embora nos últimos anos exista um número crescente de estudos avaliando a efetividade das técnicas moleculares no diagnóstico da estrogiloidíase^{53;44;51;52} ainda não há um consenso nos resultados, principalmente em relação a escolha de sequências alvos. Com isso, o presente estudo

avaliou diferentes regiões do DNA ribossomal de *S. venezuelensis* para o diagnóstico molecular, ao longo da infecção experimental frente a dois inóculos.

A amplificação de DNA genômico a partir de amostras fecais tem permitido novas perspectivas quanto ao aprimoramento do diagnóstico laboratorial da estrogiloidiase experimental e humana. Alguns aspectos técnicos são importantes ser definidos, principalmente relacionado a sensibilidade de reconhecimento do fragmento alvo de cada alvo na reação de amplificação. Com o intuito de avaliar a sensibilidade dos alvos foram realizadas diluições obtidas a partir de DNA de larvas L3 de *S. venezuelensis*. Observou-se que o alvo 28S amplificou o fragmento alvo nas menores concentrações de DNA específico. Confirmando o estudo realizado por Krammer et al.⁴⁸ utilizando o mesmo alvo. Por outro lado, Marques et al.⁵² demonstraram que apenas uma única larva L3 de *S. venezuelensis* foi suficiente para a obtenção de amplificação positiva, utilizando o alvo Gen. Pode-se ressaltar que no presente estudo optou-se por diluições do DNA positivo ao invés da contaminação de amostras de fezes animais negativos com larvas L3 de *S. venezuelensis* como realizado por Marques et al.⁵²

Outro ponto importante é a avaliação da especificidade dos alvos para diagnóstico molecular. Para avaliar a especificidade dos alvos em nosso estudo, foram utilizadas amostras de DNA genômico provenientes de verme adulto de *H. diminuta*, *T. canis* e *S. mansoni* e cultura de *Blastocystis* sp. Com relação a PCR-Gen, pode-se observar uma amplificação inespecífica de ~400bp para *S. mansoni*. Em adição, as PCR-18S e PCR-28S apresentaram amplificações inespecíficas de cada iniciador, ou seja, ~101bp para *Blastocystis* e *S. mansoni*, e de ~181bp para *S. mansoni*. Estudos relataram resultados semelhantes aos nossos quanto a utilização de DNA genômico de outros parasitos para avaliação da especificidade. Marra et al.⁵⁰ demonstraram amplificação inespecífica da PCR utilizando o alvo Gen e DNA de *Syphacea*. Considerando a especificidade como característica fundamental para o diagnóstico molecular na infecção humana, estudos

apontam resultados diversos. O estudo realizado por Sitta et al.⁴⁴ apresenta uma especificidade de 86,7% e 70,0% para os alvos 18S e Gen, respectivamente, avaliando amostras positivas para outros parasitos. Resultados semelhantes foram apresentados por Paula et al.⁴⁹, utilizando o alvo 18S, aplicado na PCR e na qPCR.

A amplificação inespecífica foi observada em todos os alvos, o que reforça a necessidade de melhores avaliações de regiões do DNA genômico de *Strongyloides*, para a obtenção de sequencias que sejam mais específicas para serem aplicadas ao diagnóstico da estrogiloidiase humana e experimental. Uma vez que altos valores de sensibilidade e especificidade podem levar a resultados mais confiáveis da prevalência e intensidade da infecção, favorecendo o seu controle. Acrescenta-se que a utilização de métodos moleculares pode aumentar em até duas vezes na taxa de detecção do parasito *S. stercoralis*⁴³. Marra et al.⁵⁰ destaca que os testes moleculares possuem um papel importante na epidemiologia, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças parasitárias.

De um modo geral, os diferentes alvos apresentaram bons resultados, ou seja, ocorrendo amplificação do alvo na maioria das amostras ao longo da cinética experimental, independente do inoculo. Vale ressaltar que em nosso estudo foi o pioneiro em avaliar uma cinética experimental completa da infecção por *S. venezuelensis* até 35º d.p.i., considerando dois inóculos. Marra et al.⁵⁰ realizaram um estudo, utilizando amostras de fezes de grupos de animais infectados com 40L3, 400L3 e 4.000L3 de *S. venezuelensis*, no 7º d.p.i., observaram que ocorreu amplificação em todos os inóculos, utilizando o alvo Gen.

Com relação ao diagnóstico molecular, à amplificação do fragmento alvo ocorreu do 5º ao 29º d.p.i., destes em alguns dias (17º, 21º, 27º e 28º d.p.i.) não ocorreu amplificação, utilizando o alvo Gen, nos animais do grupo de 400L3. Por outro lado, no inóculo de 4.000L3 houve amplificação positiva do 6º ao 34º d.p.i., e ausência de amplificação nos 17º e 22º d.p.i. Esses resultados são semelhantes aos apresentados por

Marra et al.⁵³, com detecção de DNA específico do 6º ao 32º d.p.i. em animais infectados com 4.000L3 de *S. venezuelensis*, com aparecimento de bandas inespecíficas a partir do 10º d.p.i. Importante ressaltar o aparecimento de bandas inespecíficas à medida que ocorre a evolução da cinética experimental, ou seja, do 6º ao 29º d.p.i. e do 13º ao 35º d.p.i., nos inóculos de 400L3 e 4.000L3, respectivamente. Fato este também relatado por outros autores^{50;51;52}. A amplificação de um fragmento de aproximadamente 420pb, utilizando o alvo Gen, pode estar relacionada com a presença de DNA do rato utilizado no modelo experimental⁵⁰. Podemos inferir que na presença de grande quantidade do DNA alvo, coincidente com maiores eliminações de OPG tem-se uma amplificação positiva, sem bandas inespecíficas. Em contrapartida, na presença de pequena quantidade do DNA onde ocorre menor eliminação de ovos descrito na OPG ocorre a amplificação de bandas inespecíficas. Isto pode explicar a maior ocorrência de amplificação inespecífica no inóculo de 400L3.

Quanto ao alvo 18S, a positividade nos dois inóculos ao longo da cinética experimental mostrou-se homogênea do início ao final da infecção, ou seja, foi observado uma maior intensidade na banda nos dias de maior eliminação de ovos. A amplificação do fragmento alvo ao longo da cinética experimental, ocorreu do 5º ao 30º d.p.i., do 5º ao 31º d.p.i., nos inóculos de 400L3, e de 4.000L3, respectivamente. Não foi observado amplificação inespecífica em ambos os inóculos. Estudos desenvolvidos por Sitta et al.⁴⁶ demonstraram bons resultados utilizando o alvo 18S em amostras fecais humanas, destacando a sua utilização como uma região alvo promissora para diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*.

Em relação ao alvo 28S, pode-se observar que a amplificação do fragmento alvo ocorreu do 1º ao 35º d.p.i., sendo que em alguns dias (7º, 12º, 19º, 22º, 25º, 32º d.p.i.), nas amostras de fezes dos animais infectados com 400L3 não ocorreu amplificação. O mesmo ocorreu com as amostras dos animais do inóculo de 4.000L3, nota-se que a amplificação

ocorreu a partir do 1º d.p.i. e se estendeu até o 35º d.p.i., sendo mais homogênea do que o grupo de 400L3. Este alvo foi utilizado no estudo de Krammer et al.⁴⁸, onde observaram à amplificação de DNA específica do 4º ao 22º d.p.i. em amostras de ratos infectados com 2.500L3 de *S. ratti*, utilizando a qPCR. Embora, os resultados da PCR-28S demonstraram maior sensibilidade e especificidade, não podemos deixar de destacar que a visualização de amplificação no 1º d.p.i. foi inesperada, sobretudo porque somente após o 2º d.p.i. ocorre a chegada do parasito no intestino delgado^{55,56}. Além disso não podemos esquecer que esta amostra em especial não foi sequenciada, e possivelmente pode ser devido a uma amplificação inespecífica.

Quando avaliamos à intensidade de visualização da banda alvo no gel de agarose pode-se observar que ocorreu variações. Ressalta-se que as PCR-18S e PCR-28S, apresentaram menores variações, principalmente no grupo infectado com 4.000L3 ao longo da infecção experimental. Acrescenta-se que a uniformidade na intensidade ficou maior nos dias com maior eliminação de ovos.

Após análise do sequenciamento obtido dos produtos de PCR com amplificação positiva, pode-se verificar que as sequências geradas na sua maioria, apresentaram identidade com o DNA ribossomal do gênero *Strongyloides*. Ressalta-se que as sequências obtidas na PCR-28S apresentaram uma maior qualidade, independente do inóculo. Fato este confirmado pela análise das sequências geradas, uma vez que, estas apresentaram valores de identidade variando de 95 a 100% para as sequências do gênero *Strongyloides* depositadas na base de dados, independente do dia pós infecção e do inóculo, exceto no 5º d.p.i. do grupo 4.000L3. Pode-se destacar que o produto de PCR referente a esta sequência apresentou uma banda fraca no gel de agarose. Acrescenta-se que as sequências obtidas alinharam com diferentes espécies dentro do gênero *Strongyloides*, como: *S. ratti*, *S. fuelleborni*, *S. stercoralis*, o que ressalta a alta especificidade deste alvo.

As sequências geradas nas PCR-18S e PCR-Gen, no geral apresentaram qualidades bem variadas. Fato que foi confirmado pela não formação de *contig* e pelo tamanho do fragmento gerado, muitas das vezes não correspondendo ao tamanho esperado, além dos valores de identidade. Acrescenta-se que ocorreu alinhamento com sequências de outros organismos presente no banco de dados. As sequências obtidas com o alvo Gen apresentaram identidade com: *Alloionema appendiculatum* (nematódeo associado a moluscos gastrópodes); *Penalis vanemmei* (camarão marinho) e *Triticum aestivum* (espécie de planta). Por outro lado, as sequências obtidas com o alvo 18S apresentaram identidade com: *Blastocystis* sp. (protista comumente encontrado em amostras de fezes humanas e de animais) e *A. appendiculatum*. O alinhamento com sequências de outros organismos na base dados, pode estar relacionado com a amplificação de regiões do gene de DNA ribossomal comum em nematódeos, uma vez que, as sequências ribossomais são altamente conservadas entre os organismos^{41;45}. Ou ainda pode ser devida a competição entre DNAs mais ou menos abundantes presentes nas amostras durante a PCR⁵⁰. Acrescenta-se ainda, que muitas das amostras não sequenciadas ou com baixa qualidade, e sem formação de *contigs*, são originárias de produtos de PCR com bandas fracamente observadas no gel de agarose.

Quando comparamos o resultado de OPG com a PCR, pode-se observar uma constância nos dados. Considerando as amostras dos animais do grupo 400L3, as PCRs utilizando os alvos Gen e 18S apresentaram amplificação do fragmento alvo no início da eliminação de ovos (5º d.p.i.) até 29º e 30º d.p.i., respectivamente, enquanto que a positividade da OPG foi observada até o 33º d.p.i. Por outro lado, no grupo 4.000L3, a PCR utilizando o alvo Gen foi positiva do 6º ao 35º d.p.i. Em relação ao alvo 28S, a PCR foi positiva em toda a cinética experimental (1º ao 35º d.p.i.), principalmente no grupo 4.000L3, enquanto que a OPG foi positiva do 6º ao 34º d.p.i. Em síntese, a maioria das amostras com resultado parasitológico positivo foram também positivas na PCR. Resultados semelhantes foram descritos em diversos estudos^{50;53;51;52}. Interessante

pontuar que nestes estudos foram realizados com o alvo Gen como alvo. Acrescenta-se que com a evolução da cinética experimental, com a redução do número de OPG, ocorre a amplificação de fragmentos inespecíficos em ambos os inóculos (400L3 ou 4.000L3), considerando o alvo Gen. Fato também já destacado na literatura^{50;52;53}.

Quando consideramos a sensibilidade das técnicas parasitológicas e moleculares, a literatura é concordante em destacar a maior sensibilidade da PCR versus OPG. Paula et al.⁵² demonstraram maior sensibilidade da PCR em comparação a OPG na detecção da infecção de *S. venezuelensis* em amostras de animais. Os presentes resultados confirmam estas observações, principalmente no grupo de 4.000L3, onde a positividade da PCR antecipou a positividade da OPG. O mesmo ocorre na strongiloidíase humana, ou seja, diversos estudos afirmam a maior sensibilidade das técnicas moleculares versus as parasitológicas para a detecção da infecção por *S. stercoralis* em amostras de fezes. Um dos trabalhos pioneiros no contexto da strongiloidíase, foi realizado por Verweij et al.⁴³, onde os autores reforçam que ocorre um aumento de 2 vezes na taxa de detecção da infecção da PCR comparada a técnica de Baermann-Moraes. Em um estudo realizado por Paula et al.⁵², o número de resultados positivos pela PCR significativamente excedeu as técnicas de Lutz, Rugai e de Placa de Ágar. Resultados semelhantes foram apontados por Pontes et al.⁷⁴ que relataram maior sensibilidade da PCR em relação a técnica de Kato-Katz para o diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni* em fezes de humanos.

Sabendo-se da dificuldade de determinar um padrão ouro para o diagnóstico da strongiloidíase, as técnicas parasitológicas mesmo com menor sensibilidade são utilizadas para a avaliação de métodos moleculares. No presente estudo, pode-se observar que a sensibilidade de cada alvo foi variada, onde os alvos apresentaram valores de 72,4%; 86,2% e 79,3%, Gen, 18S e 28S, respectivamente, no grupo de 400L3. E de 90% (alvos Gen e 18S) e 100% (28S). Estudos utilizando o modelo experimental demonstram 57,1 a 100% de sensibilidade para o alvo Gen^{50;52}. No entanto estes autores consideraram

apenas alguns pontos dentro cinética experimental, diferente do presente estudo que apresentou a cinética completa. No contexto da aplicação no diagnóstico da infecção humana, Sitta et al.⁴⁴ avaliando os alvos 18S e Gen, verificaram uma sensibilidade de 84,8% e 78,8%, respectivamente. Schar et al.³⁴ utilizando o alvo 18S encontraram sensibilidade de 88,9% no Camboja. Saugar et al.⁷⁵ utilizando o alvo 18S apresentou uma sensibilidade de 93,8% na Espanha e Becker et al.⁷⁶ de 76,8% no Oeste da África. Uma possível explicação para a ausência de amplificação em amostras sabidamente positiva pelos métodos parasitológicos pode ser a presença de inibidores da amplificação de DNA⁶⁴. Oikarinen et al.⁷⁷ destacaram que é frequente amostras de fezes conterem inibidores de DNA, e estes podem influenciar os resultados dos ensaios de PCR. Os estudos realizados por Sitta et al.⁴⁴ demonstraram que a presença de inibidores nas fezes pode levar a degradação do DNA, reduzindo a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes.

Para um método ser considerado ideal para a detecção de uma determinada infecção deve ser sensível e específico. Nesta perspectiva, alguns pontos devem ser avaliados, inicialmente, a PCR utilizando o alvo 28S antecipou e estendeu a positividade da infecção por *S. venezuelensis* ao longo da cinética experimental, considerando o resultado da OPG e dos outros alvos avaliados (Gen e 18S). Em segundo, as sequências obtidas apresentam uma maior qualidade, e identidade na base de dados. Assim os presentes resultados apontam para uma maior sensibilidade e especificidade do alvo 28S. Interessante pontuar que a aplicação deste alvo no contexto do diagnóstico da strongiloidíase foi destacado somente um único estudo⁴⁸, porém utilizando a análise de um número reduzido de amostras. Acrescenta-se que ainda não houve relatos sobre o sequenciamento das três regiões do DNA ribossomal de *Strongyloides* utilizadas neste estudo, ao longo de uma cinética experimental.

Algumas limitações podem ser apontadas no presente estudo, como a possibilidade de prolongar a infecção experimental, para avaliação dos alvos após a

resolução completa da infecção. Acrescenta-se também a possibilidade de avaliação de outros alvos, como os genes mitocondriais, também utilizados em avaliações moleculares⁴¹. Ou ainda a utilização da PCR em tempo real para aumentar a sensibilidade de detecção de DNA específico, sobretudo nos dias anteriores e posteriores a observação de ovos nas fezes dos animais infectados. É importante destacar a dificuldade da utilização de amostras de fezes para a extração de DNA, além da possibilidade da presença de inibidores da polimerase, tem-se a dificuldade de se quantificar com exatidão o DNA extraído, o que pode comprometer a sensibilidade da PCR, ou seja, alta quantidade de DNA pode também inibir a PCR, levando a resultados falso-negativos. Esta possibilidade não pode ser descartada nas amostras com PCR negativa, mesmo com a realização da triplicata. No entanto, no presente estudo objetivou a maior praticidade na realização da PCR, considerando os diferentes alvos, o que facilita o seu emprego na rotina laboratorial diagnóstica molecular da estrogiloidíase.

Diante disso pode-se concluir que o diagnóstico molecular, sobretudo a região alvo 28S, em combinação com as técnicas parasitológicas pode ser utilizada ao longo da cinética experimental com *S. venezuelensis*, o que reforça a sua aplicação no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

7 CONCLUSÃO

- a) As regiões alvos avaliados apresentaram bons resultados para detecção de DNA de *S. venezuelensis* ao longo da cinética experimental em ambos os inóculos (400 e 4.000L3);
- b) A PCR-28S mostrou-se mais sensível e específica para a detecção de DNA de *S. venezuelensis* ao longo da cinética experimental em ambos os inóculos (400 e 4.000L3).

8 BIBLIOGRAFIA

- 1 - Vadlamudi RS, Chi DS, Krishnaswamy G. Intestinal strongiloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clin Molec allergy**. v. 30, p. 4-8, 2006.
- 2 - Grove DI. Human strongyloidiasis. **Adv Parasitol**. v. 38, p. 251-309, 1996.
- 3 - Pires ML, Dreyer G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v. 48, p.175-82, 1993.
- 4 - Costa-Cruz JM. *Strongyloides stercoralis*. In: Never DP; Melo AL; Linardi PM; Almeida Vitor RW. **Parasitologia Humana**. 12 ed; Rio de Janeiro: Atheneu, p. 295-305, 2011.
- 5 - Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: importância e técnicas. **Rev Patol Trop**. v. 35, p. 173-84, 2006.
- 6 - Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 103, p. 967-72, 2009.
- 7 - Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. **Rev Serv Saúde Pública**. v. 1, p. 507-624, 1948.
- 8 - Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infect Dis Clin North Am**. v. 7, p. 655-82, 1993.
- 9 - Rey L. *Strongyloides stercoralis* e estrongiloidíase. In: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 581-90, 2001.

- 10 - Park JO, Pan J, Möhrle F, Schupp MO, Johnsen R, Baillie DL, et al. Characterization of the astacin family of metalloproteases in *C. elegans*. **BMC Dev Biology**. v. 28, p. 10-14, 2010.
- 11 - Neves DP. Parasitologia Dinâmica. 3 ed., São Paulo: Atheneu, 2009.
- 12 - Porto MAF, Muniz A, Junior OJ, Carvalho J, Marcelino E. Implicações clínicas e imunológicas entre o HTLV-1 e a esrongiloidíase. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 35, p. 641-649, 2002.
- 13 - Gryschek RCB, Siciliano RF. Esrongiloidíase. In: VERONESI. **Trat Inf**. 3ª ed. São Paulo. Atheneu, 2005.
- 14 - Fardet L, Gènereau T, Poirot JL, Guidet B, Kettaneh A, Cabane J. Severe strongiloidiasis in corticosteroid-treated patients: Cases series and literature review. **J Infection**. v.54, p. 18-27, 2007.
- 15 - Concha AR, Harrington JRW, Rogers AL. intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. **J Clin Gastroenterol**. v. 39, p. 203-11, 2005.
- 16 - Luna BO, Grasselli R, Ananias M, Pinto ST, Bozza AF, Soares M, et al. Esrongiloidíase Disseminada: Diagnóstico e Tratamento. **Rev Bra Terapia Intensiva**. v. 19(4), p. 463-68, 2007.
- 17 - Toledo R, Munõz-Antoli C, Esteban JG. Strongiloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. **Adv Parasitol**. v. 88, p. 166-241, 2015.
- 18 - Conway DJ, Atkins NS, Lillywhite JE, Bailey JW, Robinson RD, Lindo JF, et al. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 87, p. 173-6, 1993.

- 19 - Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Curr Opin in Infect Disease**. v. 25, p. 458-463, 2012.
- 20 - Marcos LA, Terashima A, Dupont HL, Gotuzzo E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 102(4), p. 314-318, 2008.
- 21 - Taylor DM, Van der Werf N, Maizels MR. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. **Tren Immunol**. v. 33(4), p.181-9, 2012.
- 22 - Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Rev Immunol**. v. 3, p. 733-44, 2003.
- 23 - Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on Strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Curr infect dis repor**. v. 13(1), p. 35-46, 2011.
- 24 - Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongiloidiasis: a systematic review. **PLoS Neglet Tropical Disease**. v. 7(e-2002), p. 1-10, 2013.
- 25 - Ash LR, Orihel TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press, **American Soc Clinic Pathol**, Chicago. 1991.
- 26 - Onuigbo MAC, Ibeachum GI. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. p. 85-97, 1991.
- 27 - Kim J, Joo HS, Kim DH, Lim H, Kang YH. A case of gastric strongyloidiasis in a Korean patient. **Korean J Parasitol**. v. 41(1), p.63-67, 2003.
- 28 - Segarra-Newnham M. Manifestations, diagnosis and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Ann Pharmacol**. v. 41, p. 1992-2001, 2007.

- 29 - Hira PR, Al-Ali F, Sheweiki HM, Abdella NA, Johny M, Francis I, et al. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 98(3), p. 261-270, 2004.
- 30 - Baermann G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededdel Mit h. **Gen Lab Weltvreden Feestbundel**. p. 47-7, 1917.
- 31 - Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 14, p. 5-8, 1954.
- 32 - Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in Strongyloides stercoralis infection. **Am J Trop Med Hyg**. v. 60, p. 967-73, 1999.
- 33 - Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Assato R et al., Efficacy of agar-plate culture in detection of Strongyloides stercoralis infection. **J Parasitol**, v. 76, p. 425-8, 1990.
- 34 - Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Trop**. v. 135, p.33-43, 2014.
- 35 - Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L et al. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, p. 346-50, 2001.
- 36 - Sykes AM, McCarthy JSA coproantigen diagnostic test for Strongyloides infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, p. e955, 2011.
- 37 - Rossi CL, Takahashi EEH, Teixeira ALS, Barros-Mazon S, Trevisan RCG. Avaliação de preparações antigênicas de Strongyloides stercoralis para o imunodiagnóstico da strongiloidiase. **Rev Soc Bra Med Trop**. v. 26, p. 83–7, 1993.

- 38 - Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Evaluation of Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Park J Med Sci.** v. 20, p. 36-40, 2004.
- 39 - Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of the recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Mol Biochem Parasitol.** v. 125, p. 73-81, 2002.
- 40 - Gonzaga HT, Ribeiro VS, Feliciano ND, Manhani MN, Silva DA, Ueta MT et al. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. **Immunol Lett.** v. 139, p. 87–92, 2011.
- 41 - Sithithaworn P, Srisawangwong T, Tesana S, Daenseekaew W, Shiththaworn J, Fujimaki Y et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. **Trans R Soc Trop Med.** v. 97, p. 398-402, 2003.
- 42 - Wong SS, Kitty SC, Sandy C, Rosana WS, Sally CY, Kwok YY. Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why. **Exp Biol Med.** p. 1-18, 2014.
- 43 - Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clin Microbiol Rev.** v. 8, p.113-130, 1995.
- 44 - Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienens EA, Polderman AM et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 103, p. 342-6, 2009.
- 45 - Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RCB, Paula FM et al. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology.** v 28, p. 1-6, 2014.
- 46 - Stensvold CR, Lebbad M, Verweij JJ. The impact of genetic diversity in protozoa on molecular diagnostics. **Trend Parasitol.** v. 27, p. 53-8, 2011.

- 47 - Gordon C, Gray D, Gobert G, McManus D. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. **Mol Cel Proebs**. v. 25, p. 143-52, 2011.
- 48 - ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travelers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 28, p. 1045-1053, 2009.
- 49 - Krammer S, Nissem N, Soblik H, Erttmann K, Tannich E, Fleischer B, et al. Novel real-time PCR for the universal detection of Strongyloides species. **J Med Microb**. v. 4, p. 454-458, 2011.
- 50 - Paula FM, Malta FM, Marques PD, Sitta RB, Pinho JR, Gryscek RC et al. Molecular diagnosis of strongyloidiasis in tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 110(2), p. 272-4, 2015.
- 51 - Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL, Amarante AF Sartori A, Amarante MR. Faecal examination and PCR to detect Strongyloides venezuelensis in experimentally infected lewis rats. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 105, p. 57-61, 2010.
- 52 - Paula FM, Sitta RB, Malta FM, Gottardi M, Corral MA, Gryscek RCB et al. Parasitological and molecular diagnosis in experimental Strongyloides venezuelensis infection. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 55(2), p.141-3, 2013.
- 53 - Marques PD, Malta FM, Meisel DM, Corral MA, Pinho JR, Costa-Cruz JM, et al. Diagnosis of the strongyloid nematode Strongyloides venezuelensis in experimentally infected rats. **J Helminthol**. v. 14, p. 1-6, 2015.

- 54 - Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL et al. Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in lewis rats: comparasion of histological analyses and PCR. **Exp parasitol.** v. 127, p.334-9, 2011.
- 55 - Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires MR, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM et al. *Strongyloides venezuelensis* Alkaline Extract for the Diagnosis of Human Strongyloidiasis by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.98(6), p.849-851, 2003.
- 56 - Negrão-Corrêa DA. Aspectos da biologia de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 e de *Strongyloides* sp. Isolados de roedores silvestres em 100 infecções de camundongos Swiss. 167f [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; p. 17-25, 1990.
- 57 - Takamure A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int J Parasitol.** v. 25, p. 907-11, 1995.
- 58 - Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **Int J Parasitol.** v.20, p. 57-62, 1990.
- 59 - Satou T, Koga M, Matsushashi R, Koike K, Tada I, Nikaido T. et al. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Vet. Parasitol.** v.104, p.131-138, 2002.
- 60 - Negrão-Corrêa DA, Pinho V, Souza DG, Pereira ATdeM, Fernandes A, Scheurmann K et al. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow derived cell is essential for the elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Int J Parasitol.** v. 36, p. 1185-95, 2006.
- 61 - Satou T, Koga M, Koike K, Tada I, Nikaido T. et al. Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Vet. Parasitol.** v.99, p.311-322, 2001.

- 62 - Chaves LA et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for evaluation of fecal samples of immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**. v. 142(14), p.1715-21, 2015.
- 63 - Repetto SA, Alba-Soto SD, Carzola SI, Tayeldin ML, Cuello S, Lasala MB, et al. An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. **Acta Trop**. v. 126, p.110-114, 2013.
- 64 - Mineo JR, Silva DAO, Sopoiete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia L. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. 1 ed. Uberlândia: EDUFU; 2005.
- 65 - Looss A. The anatomy and life history of *Ag Chylostoma duodenale* Dub. Parte II. The development in the free state. Ministry of Eowcation, Egypt. **Records School Med**. v. 4, p. 163-613, 1911.
- 66 - Gordon C, Gray D, Gobert G, McManus D. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. **Mol Cel Proebs**. v. 25, p. 143-52, 2011.
- 67 - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v. 2, 1989.
- 68 - Dorris M, Viney ME, Blaxter ML. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **Int J Parasitol**. v. 32, p. 1507-1517, 2002.
- 69 - Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 74(12), p. 5463-7, 1977.

70 - Kimura E, Shintoku Y, Kadosaka T, Fujiwara M, Kondo S, Itoh M, et al. A second peak of egg excretion in *Strongyloides ratti*-infected rats: its origin and biological meaning. **Parasitology**. v. 119, p. 221-6, 1999.

71 - Nakai E, Amarante AFT. Experimental infection in mice (*Mus musculus*) and (*Rattus norvegicus*) by *Strongyloides venezuelensis*. **Braz J Vet Parasitol**. v.10, p. 1-6, 2001.

72 - Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Gouvêia AJ, Teixeira MM et al., Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infect Imm**. v. 70(11), p 6263-6272, 2002.

73 - Douch, PGC, Green RS, Morris CA, McEwan JC, Windon RG. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. **Int. J Parasitol**. v.26, p.899-911, 1996.

74 - Repetto AS, Ruybal P, Solana ME, López C, Berini CA, Alba Soto CD, Cappa SM. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: A proposed algorithm. **Acta Trop**, v. 157, p. 169-77, 2016.

75 - Pontes, LA. et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **American J Trop Med Hyg**, v.68, p.652-656, 2003.

76 - Saugar JM, Merino FJ, Martín-Rebadan P, Fernandes-soto P, Ortega S, Garate T et al. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. **Acta Trop**. v. 142, p, 20-5, 2015.

77 - Becker SL, Piraisoody N, Kramme S, Marti H, Silué KD, Panning M. Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Cote d'Ivoire: diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. **Acta Trop**. v. 150, p. 210-7, 2015.

78 - Oikarinen S, Tauriainen S, Viskari H, Simell O, Knip M, Virtanen S, et al. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. **J Clin Virol.** v. 44, p. 211-214, 2009.