Priscilla Duarte Marques

Diagnóstico molecular da infecção por *Strongyloides venezuelensis* pela
detecção específica de DNA em amostras de ratos experimentalmente
infectados

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula

São Paulo

2015

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Marques, Priscilla Duarte

Diagnóstico molecular da infecção por *Strongyloides venezuelensis* pela detecção específica de DNA em amostras de ratos experimentalmente infectados / Priscilla Duarte Marques. – São Paulo, 2015.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo - para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Fabiana Martins de Paula

Descritores: 1. ESTRONGILOIDÍASE. 2. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE. 3. ELISA. 4. PARASITOLOGIA – DIAGNÓSTICO

USP/IMTSP/BIB-03/2015.

*Dedico esta dissertação primeiramente
a Deus, por ser o meu ajudador, o meu refúgio e
a minha fortaleza, pois sem ELE nada seria
possível.*

*Aos meus pais, Paulo da Silveira
Marques e Patrícia Duarte Marques, a
quem devo tudo o que sou hoje, agradeço por
todas as vezes que estiveram ao meu lado, me
deram todo amor do mundo, carinho, educação e
incentivo para que eu pudesse chegar até aqui.*

*Ao grande amor da minha vida,
André Lopes Fonseca, por seu amor que me
torna uma pessoa melhor a cada dia, você
contribuiu para o meu enriquecimento e
crescimento pessoal. Você é a minha inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a DEUS por tudo que me tem proporcionado, por todas as provas e desafios a mim impostos e pelos meus sucessos alcançados, pelas pessoas que ELE tem colocado em meu caminho que tanto me ajudam a seguir em frente e superar os obstáculos.

À Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula, pesquisadora científica do laboratório de Imunopatologia da esquistossomose do Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, desde já lhe agradeço pela dedicação e atenção em ser minha orientadora, pelo seu tempo disponível em ouvir minhas dificuldades e ajudar a solucioná-las, pela paciência em corrigir meus erros e me fazer acertar; e a amizade ao me aconselhar sobre a vida. Obrigada por me conduzir ao caminho da pesquisa e a ampliar meus horizontes.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek que permitiu a minha permanência neste laboratório e por ter acreditado no meu trabalho, obrigada.

À Dra. Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo por compartilhar suas experiências profissionais e por ser sempre uma pessoa gentil e agradável.

A todos os Funcionários do Imunopatologia da esquistossomose do Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Dra. Dirce Mary Correia Lima pela disposição na ajuda com a sorologia, e a ser uma pessoa preocupada e atenciosa com todos.

Agradeço ao Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pelo apoio técnico e em especial a Dra. Fernanda de Mello Malta por toda ajuda e suporte dado ao meu trabalho e a disponibilidade nunca negada.

À Géssica Baptista de Melo, que nestes dois anos nos tornamos amigas e por estar sempre disposta a me ajudar no que fosse preciso.

Ao amigo MSc. Marcelo Andreetta Corral por contribuir no desenvolvimento deste trabalho, por compartilhar seus conhecimentos e ser sempre solista.

A Eliane Araújo, secretária do programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por ser uma excelente profissional, só tenho a te agradecer por toda ajuda prestada.

A minha família, meu pai Paulo da Silva Marques, minha mãe Patrícia Duarte Marques e ao meu marido André Lopes Fonseca, por permanecerem ao meu lado nos momentos bons e ruins, por terem me dado incentivo e motivação ao longo deste período.

Ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro. Obrigada a todos que contribuíram para que meu trabalho fosse desenvolvido e concluído com sucesso.

*“O criador não dá a você o desejo de fazer o
que você não tem capacidade para fazer”*

“Jesus Cristo”

RESUMO

Marques PD. Diagnóstico molecular da infecção por *Strongyloides venezuelensis* pela detecção específica de DNA em amostras de ratos experimentalmente infectados (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

Strongyloides venezuelensis é um parasita intestinal de ratos frequentemente utilizado como modelo para o estudo da estrongiloidíase humana e animal. O objetivo deste estudo foi comparar os métodos parasitológicos, sorológico e molecular no diagnóstico da infecção experimental por *S. venezuelensis* em ratos (*Rattus norvegicus*). Amostras de fezes e soro foram colhidas e analisadas até o 60º dia pós-infecção (d.p.i.). Os métodos parasitológicos (contagem de ovos por gramas de fezes e cultura em carvão) foram positivos do 5º ao 45º d.p.i. Utilizando o teste sorológico (imunoenzimático, ELISA), os níveis séricos de anticorpos IgG aumentaram até o 28º d.p.i., e posteriormente reduziram até o 60º d.p.i. A reação em cadeia da polimerase (PCR) detectou DNA específico de *S. venezuelensis* nas amostras de fezes do 5º até 21º d.p.i. e do 2º até o 8º d.p.i. nas amostras de soro. Conclui-se que a detecção de DNA de *S. venezuelensis*, a partir de amostras de soro, é uma ferramenta diagnóstica promissora. Portanto, o presente estudo apresenta uma importante contribuição na melhoria do diagnóstico da estrongiloidíase experimental.

Descritores: Estrongiloidíase; Reação em Cadeia da Polimerase; ELISA e Parasitologia- Diagnóstico.

ABSTRACT

Marques PD. Molecular diagnosis of *Strongyloides venezuelensis* infection by DNA specific detection in samples of experimentally infected mice (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

Strongyloides venezuelensis is an intestinal parasite of rats frequently used as a model for studying animal and human strongyloidiasis. The aim of this study was to evaluate the parasitological, serological and molecular methods for the diagnosis of experimental *S. venezuelensis* in rats (*Rattus norvegicus*). Stool and serum samples were collected and analyzed up to 60 days post-infection (d.p.i.). The parasitological methods (eggs per gram of feces and charcoal culture) were positive from 5 to 45 d.p.i. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) serum levels of IgG antibodies increased up to 28 d.p.i. and thereafter decreasing by 60 d.p.i. Polymerase chain reaction (PCR) assays detected *S. venezuelensis* DNA in stool samples of rats from 5 to 21 d.p.i. and in serum samples from 2 to 8 d.p.i. In conclusion, detection of *S. venezuelensis* DNA from serum samples is a promising diagnostic tool. The present study presents an important contribution to improve the diagnosis of experimental strongyloidiasis.

Descriptors: Strongyloidiasis; Polymerase Chain Reaction; ELISA and diagnosis-parasitology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição Mundial da estrogiloidíase.....	12
Figura 2	Ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	16
Figura 3	Estágios evolutivos de ovo (a) e de larva infectante (b) de <i>S. venezuelensis</i> recuperados após a realização dos métodos parasitológicos nas amostras de ratos infectados experimentalmente.....	41
Figura 4	Estágio evolutivo de fêmea parasita de <i>S. venezuelensis</i> obtido do intestino delgado de ratos infectados experimentalmente (a- fêmea parasita adulta e b- detalhe do útero).....	43
Figura 5	Curva ROC, indicando o <i>cut-off</i> , a sensibilidade (SE), a especificidade (ES) e área sob a curva (AUC), programa Graph Pad Prism (versão 5.0) do teste ELISA, utilizando extrato alcalino de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> . A curva ROC foi obtida a partir de amostras de soro dos animais infectados em relação aos animais não-infectados.....	44
Figura 6	Cinética de detecção de IgG específica para larva de <i>S. venezuelensis</i> em amostras de soros de ratos experimentalmente infectados. (N) controle negativo. A linha representa o limiar de reatividade (<i>cut-off</i> = 138). As barras indicam a média (n=6), p<0,05.....	45
Figura 7	Amplificação de DNA, utilizando o <i>primer</i> gênero (340bp), a partir de amostras de fezes de ratos não infectados contaminadas artificialmente com 1, 10, 50 e 100 L3 de <i>S. venezuelensis</i> (1, 2, 3 e 4, respectivamente). CP (controle positivo, L3 de <i>S. venezuelensis</i>), PM (Padrão de peso Molecular, 100bp).....	46
Figura 8	Amplificação de DNA, utilizando o <i>primer</i> gênero (340bp), a partir de amostras de vermes adultos de <i>S. muris</i> (1), vermes adultos de <i>H. diminuta</i> (2) e de amostras de fezes, soro e baço não infectado (3, 4 e 5, respectivamente). CP (controle positivo, L3 de <i>S. venezuelensis</i>), CN (controle negativo, <i>mix</i> da reação de PCR sem DNA), PM (Padrão de peso Molecular, 100bp).....	47
Figura 9	Sequência obtida após a amplificação do DNA de larva filarioide de <i>S. venezuelensis</i> , utilizando o <i>primer</i> gênero (<i>forward</i> e <i>reverse</i> estão demarcados).....	47

Figura 10	Amplificação de DNA, utilizando o <i>primer</i> gênero (340bp), a partir de amostras de fezes de animais experimentalmente infectados (2, 5, 8, 13, 21, 28, 35, 45 e 60 dias pós-infecção, 1-9 respectivamente), de amostras de fezes de ratos não infectados (10). CP (controle positivo, L3 de <i>S. venezuelensis</i>), CN (controle negativo, <i>mix</i> da reação de PCR sem DNA), PM (Padrão de peso Molecular, 100bp).....	48
Figura 11	Amplificação de DNA, utilizando o <i>primer</i> gênero (340bp), a partir de amostra de baço de animal não infectado (1); L3 de <i>S. venezuelensis</i> (2), soros de animal experimentalmente infectados (2, 5, 8, 13, 21, 28, 35, 45 e 60 dias pós-infecção, 3-11 respectivamente), <i>mix</i> da reação de PCR sem DNA (12). PM (Padrão de Peso Molecular, 100bp).....	49
Gráfico 1	Contagem média de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais infectados com <i>S. venezuelensis</i> . O valor representa a média do número de ovos dos seis animais em cada dia pós-infecção (d.p.i.).....	40
Gráfico 2	Número médio de ovos observados no útero das fêmeas parasitas (n=9) de <i>S. venezuelensis</i> , obtidas dos animais infectados experimentalmente.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número médio de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais infectados experimentalmente com <i>S. venezuelensis</i>	41
Tabela 2	Fêmeas parasitas recuperadas no intestino delgado dos animais infectados com <i>S. venezuelensis</i> e o índice de fecundidade.....	42
Tabela 3	Valores de densidade óptica (DO) das amostras de soros dos animais do grupo experimental (n=6).....	45
Tabela 4	Comparação da positividade dos métodos de diagnóstico ao longo da cinética experimental, utilizando amostras de ratos infectados com <i>S. venezuelensis</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	Área sobre a curva
bp	Pares de bases
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
Cm	Centímetro
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>Cut-off</i>	Frequência absoluta do corte
D	Duodeno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	Densidade óptica
d.p.i.	Dias pós infecção
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ES	Especificidade
<i>g</i>	Giros
g	Gramas
h	Hora
I	Íleo
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
J	Jejuno
L1-L2	Larvas rabditoídes
L3	Larva filarioíde infectante
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normal
nº	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetros
OPG	Ovos por grama de fezes
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino acrescido de 0,05% tween 20
PBS-TM	Tampão fosfato-salino 0,05% tween 20% com 3% de leite desnatado em pó
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico

PM	Padrão de peso molecular
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
Rpm	Rotações por minuto
SD	Sprague- Dawley
SE	Sensibilidade
Th	Resposta T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
x	Veze

LISTA DE SIMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
>	Maior que
=	Igual
+	Positivo
-	Negativo
~	Aproximadamente
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Aspectos morfo-biológicos.....	13
1.2 Ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i>	14
1.3 Patologia e sintomatologia da estrongiloidíase.....	17
1.4 Respostas imunes do hospedeiro.....	18
1.5 Diagnóstico da estrongiloidíase.....	19
1.5.1 Diagnóstico Parasitológico de Fezes.....	19
1.5.2 Diagnóstico Sorológico.....	20
1.5.3 Diagnóstico Molecular.....	22
1.6 Estrongiloidíase Experimental.....	23
1.6.1 Aspectos biológicos de <i>S. venezuelensis</i>	23
1.6.2 <i>Rattus norvegicus</i> como modelo experimental.....	25
1.7 Justificativa.....	26
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Aspectos Éticos.....	28
3.2 Manutenção da cepa de <i>S. venezuelensis</i>	28
3.3 Desenho experimental.....	29
3.3.1 Infecção experimental dos animais.....	29
3.4 Diagnóstico Parasitológico.....	30
3.4.1 Contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	30
3.4.2 Cultura em carvão.....	30
3.4.3 Recuperação de larvas	31
3.5 Obtenção de fêmeas parasitas e análise da fecundidade.....	31
3.6 Diagnóstico Sorológico.....	32
3.6.1 Preparação de extrato alcalino de <i>S. venezuelensis</i>	32
3.6.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	32

3.7 Diagnóstico Molecular.....	33
3.7.1 Extração de DNA das amostras de fezes.....	33
3.7.2 Extração de DNA das amostras de soro	34
3.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
3.7.3.1 Controles.....	35
3.7.3.2 <i>Primers</i>	36
3.7.3.3 Reação de PCR.....	36
3.7.3.4 Eletroforese em gel de agarose.....	36
3.7.3.5 Teste de sensibilidade da PCR.....	37
3.7.3.6 Reação de sequenciamento.....	37
3.8 Análises estatísticas.....	39
3.9 Normas de biossegurança.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Diagnóstico Parasitológico.....	40
4.2 Obtenção de fêmeas parasitas e análise de fecundidade.....	42
4.3 Diagnóstico Sorológico.....	44
4.3.1 Ensaio imunoenzimático – ELISA.....	44
4.4 Diagnóstico Molecular de <i>S. venezuelensis</i>	46
4.4.1 Teste da sensibilidade e da especificidade do <i>primer</i> gênero.....	46
4.4.2 Amplificação de DNA de <i>S. venezuelensis</i> nas amostras de fezes.....	48
4.4.3 Amplificação de DNA de <i>S. venezuelensis</i> nas amostras de soros.....	48
4.4.4 Comparação da positividade dos métodos de diagnóstico na infecção experimental com <i>S. venezuelensis</i>	49
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase é uma infecção parasitária causada pelo nematódeo intestinal *Strongyloides stercoralis*, geralmente é assintomática e limitada ao trato gastro-intestinal em indivíduos imunocompetentes. No entanto pode assumir formas graves como a hiperinfecção e doença disseminada em casos de imunossupressão podendo evoluir para óbito (Keiser e Nutman, 2004).

Estima-se que estejam infectados com *S. stercoralis* 30 a 100 milhões de pessoas em 70 países, especialmente em áreas de clima quente e úmido, como sudeste Asiático, África e América Latina (Schar et al., 2013). No Brasil, a estrongiloidíase possui grande importância em saúde pública, com ocorrência em torno de 5,5% em todo território nacional (Paula e Costa-Cruz, 2011) (Figura 1). No entanto, esta helmintíase apresenta prevalência subestimada, sobretudo pelo elevado número de casos assintomáticos, fazendo com que não ocorra a suspeita clínica, além das limitações dos métodos utilizados para o diagnóstico.

Figura 1- Distribuição mundial da estrongiloidíase.
Adaptado de: <http://www.worldgastroenterology.org>

Nas regiões endêmicas, as condições de saneamento básico são precárias, dificultando a avaliação do tratamento anti-helmíntico, pelas exposições repetidas e consequentes reinfecções (Olsen et al., 2009).

1.1 Aspectos morfo-biológicos

Espécies do gênero *Strongyloides* apresentam duas gerações, uma de vida parasitária e outra de vida livre, com a presença de fêmeas na primeira e dimorfismo sexual na segunda (Moraes, 1948). São conhecidas seis formas evolutivas: fêmea partenogenética parasita, fêmea de vida livre, macho de vida livre, ovos, larvas rabditoides e larvas filarioides que são distintas morfologicamente no seu ciclo biológico (Costa-Cruz, 2005).

A fêmea parasita partenogenética possui aspecto filarioide, medindo em torno de 2,5mm de comprimento e 40µm de largura, com extremidade posterior afilada, sendo revestida por delgada cutícula com estriações transversais. O aparelho digestivo é formado por boca trilabiada, esôfago filariforme e longo, intestino simples e orifício anal em posição transversal na extremidade posterior. O aparelho reprodutor ocupa cerca de dois terços do corpo, é composto de vulva ventral no terço médio de onde parte o útero anfidelfo, ovários e ovidutos com ovos enfileirados (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

A fêmea de vida livre ou estercoral é fusiforme com porção posterior afilada, medindo 1,2mm por 0,07µm, revestida por fina cutícula estriada transversalmente. O aparelho digestivo é formado por boca, esôfago curto e rabditoide, intestino simples e anus na porção posterior. O aparelho genital organizado em vulva na região mediana do corpo, útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

O macho de vida livre apresenta corpo afilado, medindo em torno de 0,7mm de comprimento por 0,04mm de largura, revestimento composto por cutícula delgada, e estriada transversalmente, similar às fêmeas; e sistema digestivo composto por boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino simples terminado em cloaca na região caudal. A cauda é curvada ventralmente e possui dois espículos copulatórios. A genitália é composta por testículos, vesícula seminal, e pelos canais deferente e ejaculador (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

As larvas rabditoides (L1 e L2) são os primeiros estádios larvais, medindo cerca de 200 a 300µm de comprimento. Apresenta cutícula delicada e hialina, com boca diminuta e esôfago do tipo rabditoide com dilatações bulbiformes nas extremidades e constrição na parte mediana, o aparelho digestivo continuado pelo intestino e terminando na abertura anal. As larvas rabditoides apresentam primórdio genital bem evidente e vestíbulo bucal curto (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

As larvas filarioides (L3) são alongadas com aproximadamente 0,05mm de comprimento. Apresentam revestimento com cutícula fina e estriada, e cauda entalhada característica, vestíbulo bucal curto, esôfago filarioide, intestino longo e estreito terminando em abertura anal (Grove, 1996; Rey, 2001; Costa-Cruz, 2005).

Os ovos são estruturas elipsoides de parede translúcida e embrionado, diferenciando-se somente quanto ao tamanho, entre os dois ciclos evolutivos, sendo maiores no estágio de vida livre (Grove, 1996).

1.2 Ciclo biológico de *S. stercoralis*

A infecção por *S. stercoralis* ocorre através da penetração das larvas L3, ativamente pela pele, mucosa oral ou esofágica do hospedeiro. A secreção de

proteases por essas larvas auxilia na penetração e na migração dos tecidos (McKerrow et al.,1990). Atingem os pulmões por via sanguínea sendo carregadas até a traqueia, onde são deglutidas chegando ao duodeno. Após a maturação, transformam-se em fêmeas partenogenéticas, que se alojam na mucosa duodenal, liberando os ovos embrionados. Esses eclodem dando origem as larvas rabditoides, que ao atingir a luz intestinal são eliminadas nas fezes. No ambiente, em condições adequadas de temperatura e umidade sofrem mudas, originando as larvas L3 (ciclo direto). Podem ainda dar origem a machos e fêmeas de vida livre que, após reprodução sexuada, originam larvas rabditoides. Essas por sua vez sofrem mudas originando larvas L3 (ciclo indireto). As larvas rabditoides podem sofrer mudas ainda na luz intestinal originando larvas L3, e assim penetrar pela mucosa intestinal ou pela pele da região perianal (processo de autoinfecção) (Liu e Weller, 1993; Grove,1996) (Figura 2).

Os parasitas do gênero *Strongyloides* possuem habilidades de alternar entre duas gerações, uma de vida livre ou indireta com dimorfismo sexual, e outra parasitária ou direta, com a presença de fêmeas partenogenéticas, parasitas na mucosa intestinal (Grove, 1996). Uma possível explicação é a determinação do sexo das larvas rabditoides durante a oogênese ou embriogênese, a partir de diferentes cargas cromossômicas, n , $2n$ e $3n$, correspondentes aos machos, fêmeas de vida-livre (ciclo indireto) e as larvas filarioides (ciclo direto), fato este suportado recentemente pelos resultados verificados por Nemetschke et al. (2010).

O processo de auto-infecção pode ocorrer na estrongiloidíase. A auto-infecção é considerada externa quando decorre da transformação de larvas rabditoides em filarioides na região anal e perianal contaminada com fezes. É interna quando as condições locais do intestino propiciam a evolução das formas larvárias do parasito na luz das porções delgada e grossa, com invasão direta da mucosa por larvas filarioides que não saíram para o meio exterior. A auto-infecção

é responsável pela manutenção da infecção por meses ou anos, mesmo em indivíduos que já não residem em áreas endêmicas (Liu e Weller, 1993; Grove, 1996). Assim, uma falha na regulação do processo de auto-infecção levaria à hiperinfecção, com aumento da carga parasitária dentro dos sítios, que fazem parte do ciclo biológico do parasito, podendo levar a disseminação do mesmo por diversos órgãos. Tem sido sugerido que os corticosteroides exercem um efeito estimulatório direto sobre as larvas intra-intestinais induzindo sua muda (rabditoide em filarióide), favorecendo a auto-infecção ou ainda um efeito sobre a fêmea parasita levando ao aumento da ovoposição. Uma vez que seus metabólitos possuem estrutura bioquímica semelhante à ecdisonas, hormônio que regula a muda na maioria dos helmintos (Liu e Weller, 1993; Grove, 1996; Siddiqui e Berk, 2001; Costa-Cruz, 2005).

Figura 2- Ciclo biológico de *S. stercoralis*.

Adaptado de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/strongyloidiasis.html>

1.3 Patologia e sintomatologia da estrogiloidíase

A patologia e a sintomatologia da estrogiloidíase não estão associadas somente à carga parasitária, mas também a fatores como a diminuição da resistência do hospedeiro e ao estado nutricional do paciente (Santos, 2000). A infecção por *S. stercoralis* pode evoluir diferentemente nos pacientes infectados. Aproximadamente cerca de 50% dos indivíduos infectados evolui para uma parasitose crônica e assintomática (Vadlamudi et al., 2006). Os pacientes sintomáticos podem apresentar sintomas cutâneos, gastrintestinais e/ ou respiratórios (Siddiqui e Berk, 2003). Apesar de não possuir sintomatologia específica, os sintomas abdominais comumente relatados em pacientes com estrogiloidíase crônica, consistem de dores abdominais, náusea, anorexia, inchaço abdominal, prurido anal, alternância de períodos de constipação e diarreia.

Além de sintomas intestinais, pacientes infectados com *S. stercoralis* também podem apresentar sintomas respiratórios inespecíficos decorrentes da migração larval, tais como tosse, broncoespasmos, respiração curta, chiado e infiltrado pulmonar transitório; e raramente casos graves de asma, bronquite crônica e broncopneumonia (Concha et al., 2005).

Em pacientes com imunossupressão, a doença pode tomar proporções ainda maiores, culminando em hiperinfecção e/ou disseminação do parasito por todo o organismo (Conway, 1993; Grove, 1996; Siddiqui e Berk, 2003; Concha et al., 2005). Nos casos graves há a possibilidade de ocorrer broncopneumonia e abscessos associados a infecções bacterianas, ou ainda sinais de esteatorreia, síndrome de má absorção, isquemia mesentérica, enteropatia perdedora de proteínas, íleo paralítico e obstrução intestinal (Andrade-Neto e Assef, 1996; Keiser e Nutman, 2004; Vaiyavatjamai et al., 2008).

1.4 Respostas imunes do hospedeiro

No mecanismo T-independente ocorre à produção de mediadores da inflamação antígeno-inespecífico pelos macrófagos, como fator necrose tumoral (TNF) e IL-1, que atuam nas células caliciformes do intestino estimulando a produção de muco (Maruyama et al., 2000). Por se tratar de um helminto o padrão de resposta imunológica celular induzida é Th2, com secreção de citocinas específicas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-21) (Maizels, 2003; Costa-Cruz, 2005; Montes et al., 2009).

Anticorpos das classes IgM, IgA e IgG específicos, além de IgE, também são produzidos pelo hospedeiro na resposta imune contra *S. stercoralis*. Evidências experimentais indicam que o sistema complemento e que anticorpos específicos, especialmente IgM e IgG, participam do mecanismo de destruição de larvas em associação com eosinófilos e/ou neutrófilos (Brigandi et al., 1996; Herbert et al., 2000; Ligas et al., 2003). Como o ciclo do parasito envolve as mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por IgA (Atkins et al., 1999; Costa et al., 2003; Costa-Cruz 2005; Mota-Ferreira et al., 2009; Ribeiro et al., 2010).

As interleucinas induzem rápida resposta humoral mediada por anticorpos da classe E (IgE) antígeno-específica e resposta celular mediada por mastócitos, basófilos e eosinófilos (Genta, 1986; Elliott, 2007; Negrão-Corrêia et al., 2006).

1.5 Diagnóstico da estrogiloidíase

Em virtude das peculiaridades de seu ciclo biológico e da frequente ausência de sintomatologia a infecção por *S. stercoralis* apresenta dificuldade para seu diagnóstico (Liu e Weller, 1993; Siddiqui e Berk, 2001).

1.5.1 Diagnóstico Parasitológico de Fezes

Métodos parasitológicos diretos de diagnóstico consistem no encontro das formas evolutivas de *S. stercoralis*. Os parasitos, menos rotineiramente, podem ser encontrados em fluidos de aspirado duodenal, lavado brônquico, escarro, urina, esfregaço de sangue periférico e líquido; ou amostras de tecido sólido, como de biópsia de pele e de mucosa do aparelho digestivo obtidas por endoscopia (Onigbo e Ibeachum, 1991; Liu e Weller, 1993; Van Doorn et al., 2007).

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase normalmente é realizado pelo encontro de larvas nas fezes. Entretanto, na maioria dos casos a eliminação de larvas nas fezes é pequena e irregular, o que dificulta a detecção da infecção (Liu e Weller, 1993; Sudré et al., 2006; Levenhagen e Costa- Cruz, 2014.).

Uma única amostra de fezes examinada para a investigação de larvas propicia a identificação de cerca de 30% das infecções. A sensibilidade aumenta para 50% se forem usadas três amostras fecais, podendo chegar perto de 100% com o uso de sete amostras (Uparanukraw et al., 1999). Como o exame de múltiplas amostras de fezes é bastante inconveniente para o paciente e consome muito tempo, a maioria dos médicos reluta em utilizá-lo, o que pode acarretar em um resultado falso-negativo (Andrade- Neto e Assef, 1996; Siddiqui e Berk, 2001; Hira et al., 2004).

Várias são as técnicas utilizadas para o diagnóstico parasitológico da *estrongiloidíase*, entre as quais são mais comuns: exame direto com uso de solução salina e lugol, métodos de concentração por sedimentação, métodos como o Baermann-Moraes e suas variações, cultura em placa de ágar e método de Harada-Mori (Grove, 1996; Levenhagen e Costa-Cruz, 2014). Os métodos de Baermann-Moraes e o de Rugai et al. (1954), baseados no termo e hidrotropismo das larvas, possuem melhor sensibilidade, além de rapidez de execução e uso de grande volume de material fecal (Rey, 2001). Ainda assim, são necessárias sete amostras fecais, colhidas em dias alternados, para se alcançar 100% de sensibilidade (Andrade- neto e Assef, 1996; Uparanukraw et al., 1999; Siddiqui e Berk, 2001).

Como as fêmeas parasitas habitam o interior do tecido intestinal e não o lúmen, não é detectável nas fezes. Assim do mesmo modo, as larvas filarioides são raramente vistas nas fezes, com exceção dos casos de hiperinfecção e de constipação intestinal (Rey, 2001). Deste modo, a falha em demonstrar larvas pode ser interpretada erroneamente como ausência da infecção (Sato et al., 1995).

1.5.2 Diagnóstico Sorológico

As técnicas sorológicas podem ser uma boa alternativa para o diagnóstico da *estrongiloidíase*. Além disso, o desenvolvimento de testes sorológicos confiáveis pode ter grande utilidade em situações epidemiológicas e clínicas (Rossi et al., 1993). Por outro lado, uma das principais limitações encontradas no desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de antígenos que permitam seu posterior fracionamento e análise. Com isso, muitos pesquisadores vêm utilizando antígenos

heterólogos, ou seja, provenientes de larvas de outras espécies de *Strongyloides*, principalmente *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezuelensis*, uma vez que são de fácil obtenção, constituem fonte segura de antígenos e não representam risco para seus manipuladores (Costa-Cruz et al., 1997; Costa-Cruz et al., 2003; Silva et al., 2003; Machado et al., 2003; Rodrigues et al., 2004), além de proporcionarem bons resultados. Outro ponto é a reatividade cruzada das preparações antigênicas de *S. stercoralis* com antígenos comuns a outros parasitos (Rossi et al., 1993; Siddiqui e Berk, 2001).

A reação de imunofluorescência indireta, utilizando-se larvas de *S. stercoralis*, *S. ratti* e *S. venezuelensis* como antígenos, pode ser utilizada como teste complementar para o diagnóstico da estrongiloidíase (Costa-Cruz et al., 1997), sobretudo em pacientes imunodeprimidos (Gottardi et al., 2015).

O teste imunoenzimático (ELISA) é considerado superior aos outros testes sorológicos, principalmente em relação à praticidade, à segurança e à disponibilidade de reagente, além de alta sensibilidade e especificidade (Rossi et al., 1993; Uparanukraw et al., 1999; Schaffel et al., 2001; Koosha et al., 2004). O teste ELISA tem sido utilizado para a pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE), específicas para o parasito. Contudo não permite estimar a carga parasitária, além de não diferenciar as infecções recentes e antigas (Liu e Weller, 1993). Outra desvantagem desta técnica é a frequente observação de resultados falso-positivos causados pela reação cruzada com antígenos de outros nematoides, como por exemplo, ancilostomídeos e filarídeos (Sithithaworn et al., 2003).

Estudos utilizando antígenos *S. venezuelensis* ou *S. ratti* na técnica de Western-blotting, têm demonstrado componentes antigênicos distintos que podem ser utilizados como método adicional no diagnóstico da estrongiloidíase (Silva et al., 2003; Rodrigues et al., 2004). A técnica de Western-Blotting também tem sido

considerada sensível e específica para o diagnóstico da estrogiloidíase (Feliciano et al., 2010).

Atualmente, vem-se procurando outras formas mais reprodutíveis de diagnóstico, que não necessitem da utilização de larvas para a preparação de antígenos. A caracterização de proteínas recombinantes expressas, de forma induzida, em outros microrganismos, pode ser uma fonte de antígenos importante no imunodiagnóstico. Entretanto, ainda não estão disponíveis como componentes de kits diagnósticos (Ravi et al., 2002). O antígeno recombinante (*NIE*) tem apresentado alta especificidade e sensibilidade podendo ser aplicado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (Buonfrate et al., 2015; Rascoe et al., 2015).

Ensaio para a detecção de coproantígeno utilizando anticorpos policlonais contra antígeno de amostras fecais humanas, adultos de *S. stercoralis* (El-Badri, 2009), e L3 de *S. venezuelensis* e de *S. ratti* (Gonçalves et al., 2010) têm sido padronizados (Sykes e McCarthy, 2011), tem apresentado resultados promissores.

1.5.3 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular tem-se mostrado bastante atrativo para detecção de parasitoses intestinais, apresentando alta sensibilidade e especificidade (Weiss, 1995), além de boa reprodutibilidade, potencial de desenvolvimento em larga escala, minimizando o tempo do diagnóstico e diminuindo o custo da técnica (Basuni et al., 2011). O material resultante da extração de DNA das amostras fecais permite fácil e prolongado armazenamento possibilitando novas investigações. No entanto, para a validação das técnicas moleculares, é importante o conhecimento de sequências específicas do material genético de parasitos, para a escolha de

marcadores capazes de detectar e diferenciar espécies e cepas (Stensvold et al., 2010; Gordon et al., 2011).

O desenvolvimento da biologia molecular tem permitido a padronização da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de material genético de *Strongyloides* sp (Verweij et al., 2009; Kramme et al., 2010; Marra et al., 2010).

A PCR tem sido mencionada como uma metodologia auxiliar, com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico molecular de *S. stercoralis* (Repetto et al., 2013; Sitta et al., 2014). A detecção de DNA do parasito em amostras fecais através da amplificação por PCR em tempo real (qPCR) utilizando iniciadores referentes ao gene ribossomal, mostrou-se sensível e específico (Verweij et al., 2009; Kramme et al., 2011).

Em um estudo com modelo experimental, analisando a infecção por *S. venezuelensis*, em relação a diferentes cargas parasitárias, a técnica de PCR convencional demonstrou grande sensibilidade na detecção do parasito, inclusive para pequenas cargas parasitárias (Marra et al., 2010). PCR utilizando amostras fecais e de tecidos de ratos infectados experimentalmente por *S. venezuelensis* tem sido proposto como complementar para o diagnóstico desta parasitose (Marra et al., 2010, 2011; Paula et al., 2013).

1.6 Estrongiloidíase experimental

1.6.1 Aspectos biológicos de *S. venezuelensis*

A espécie *S. venezuelensis* (Brumpt, 1947) foi relatada pela primeira vez na Venezuela juntamente com *S. rattí*, infectando ratos selvagens (*Rattus norvegicus*). Estas espécies, parasitos de roedores, são utilizadas no estudo da relação parasito-

hospedeiro, na produção de antígenos heterólogos para o desenvolvimento de métodos sorológicos para a estrogiloidíase humana, além de estudos sobre a eficácia de drogas (Marra et al., 2011; Satou et al., 2002).

S. venezuelensis é um parasito naturalmente encontrado em ratos (*R. norvegicus*) (Maruyama et al., 2006). O ciclo biológico de *S. venezuelensis* é semelhante à espécie homóloga. A infecção ocorre pela penetração ativa das larvas (L3) pela pele ou mucosa do hospedeiro; essas atingem o pulmão através da migração por tecidos subcutâneos e musculares (Negrão-Corrêa, 1990; Takamure, 1995). As larvas chegam ao pulmão, a partir de 36 horas pós-infecção e saem gradualmente pela traqueia, esôfago e estômago até atingir o intestino delgado, entre 48h e 96h pós-infecção, se instalando na porção inicial do duodeno. Após o estabelecimento no intestino, as larvas completam seu desenvolvimento e amadurecimento sexual, se transformando em fêmeas adultas parasitas (Negrão-Corrêa, 1990; Takamure, 1995), com 8 a 12 ovos no útero (Little, 1966; Carter e Wilson, 1989). Diferentemente do que ocorre com *S. stercoralis* os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro (Yasuda et al., 2014), e não há ocorrência do processo de auto-infecção na infecção por *S. venezuelensis*.

O pico de eliminação de ovos ocorre entre o 6º e o 18º dia e o período pré-patente na infecção por *S. venezuelensis* em roedores (camundongos e ratos) varia entre o 5º e o 8º dia após a infecção (Taira et al., 1995; Nakai e Amarante, 2001; Oliveira -Sequeira e Amarante, 2001).

Na infecção experimental por *S. venezuelensis*, o diagnóstico parasitológico pode ser realizado por meio de exame direto e de coprocultura. O diagnóstico também pode ser feito por métodos indiretos, como os ensaios imunológicos principalmente pelo teste ELISA (Gonçalves et al., 2011, 2012a). Recentemente tem sido avaliada a pesquisa de coproantígenos na infecção com *S. venezuelensis*, com resultados promissores (Gonçalves et al., 2011). A PCR também tem sido

utilizada como ferramenta para o diagnóstico molecular na infecção experimental (Paula et al., 2013; Marra et al., 2009; Kramme et al., 2011).

Como a espécie *S. stercoralis* apresenta grande dificuldade em manutenção em laboratório, *S. venezuelensis* constitui uma excelente ferramenta de estudo para desenvolvimento de métodos de diagnóstico, sejam diretos ou indiretos, os quais poderão ser aplicados posteriormente na estrogiloidíase humana.

1.6.2 *Rattus norvegicus* como modelo experimental

R. norvegicus, é pertencente à família Muridae (Harkness, 1993), e é amplamente utilizado na pesquisa biomédica que abrange as áreas de toxicologia, gerontologia, cardiologia, endocrinologia, odontologia, imunologia, reprodução, neurociência e parasitologia (Andersen, 2004).

A prevalência e a gravidade das infecções naturais e experimentais causadas por protozoários, nematódeos, trematódeos, cestódeos e artrópodes são mais elevadas em machos do que nas fêmeas (Klein, 2004). Fatores relacionados ao hospedeiro como idade, sexo e base genética influenciam diretamente a carga parasitária (Rivero et al., 2002). Estudos realizados com nematódeos intestinais utilizando linhagens isogênicas de roedores demonstram a influência de fatores genéticos associados à resistência e a suscetibilidade à infecção (Behnke et al., 2000).

Além disso, os ratos são facilmente mantidos em laboratório, eliminam considerável número de ovos nas fezes quando infectados, a coprocultura com *S. venezuelensis* não oferece risco de infecção a seus manipuladores, e é facilmente cultivado. Assim, pode-se manter a produção de antígeno no laboratório de forma

constante e segura (Gonçalves et al., 2012a). Desta forma, *R. norvegicus* constitui excelente modelo experimental para o estudo da estrogiloidíase.

1.7 Justificativa

A estrogiloidíase é uma doença parasitária importante por *S. stercoralis*. Diante da intermitência na eliminação de larvas no hospedeiro infectado e da dificuldade de obtenção de um padrão ouro para o diagnóstico parasitológico desta helmintíase, tem-se recorrido a métodos sorológicos e moleculares para se chegar a um diagnóstico rápido, com boa sensibilidade e especificidade (Siddiqui e Berk, 2001). Baseando-se no crescente aumento dos estudos que utilizam a espécie *S. venezuelensis*, seja para abordagens de aspectos da biologia e da imunologia envolvidos na infecção, ou como fonte alternativa para a produção de antígenos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (Machado et al., 2003; Rodrigues et al., 2007). No entanto até o presente momento não tem sido mencionada na literatura a utilização de amostras de soro para a extração de material genético de *S. venezuelensis* em ratos experimentalmente infectados.

Com o intuito do aprimoramento de técnicas diagnósticas para a aplicação futura na estrogiloidíase humana, propomos o estudo da PCR convencional utilizando amostras de fezes e de soro de ratos experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- a) Comparar os métodos de diagnósticos parasitológico, sorológico e molecular utilizando amostras de *R. norvegicus* experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar a intensidade da infecção pelo número de ovos por grama de fezes (OPG) e pela contagem de fêmeas partenogenéticas recuperadas no intestino delgado nos animais infectados;
- b) Realizar o diagnóstico parasitológico através da contagem de ovos por grama de fezes e da cultura em carvão, utilizando as amostras fecais dos animais infectados;
- c) Avaliar o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase pelo teste imunoenzimático (ELISA) nas amostras soro dos animais infectados;
- d) Realizar a PCR convencional em amostras de fezes e soro dos animais infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT/USP) sob número de protocolo CPE-IMT 2012/152. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo CEUA e pelo Biotério do IMT/USP (Anexo a).

3.2 Manutenção da cepa de *S. venezuelensis*

A cepa de *S. venezuelensis* utilizada, gentilmente foi cedida pela Profa Dra. Marlene Tiduko Ueta (Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP), e mantida no Biotério do IMT/USP em *R. norvegicus* linhagem Wistar, experimentalmente infectados.

As larvas infectantes (L3) foram obtidas a partir da cultura de fezes de *R. norvegicus* previamente infectados em carvão pelo método de Looss (1905 apud Neves et al., 2005). Após a cultura, as larvas recuperadas pelo método de Rugai et al. (1954) foram lavadas em solução salina tamponada de fosfato (PBS) 0,15M, pH 7,2. O sedimento de larvas foi analisado em microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão) em aumento de 10X, para a contagem das larvas L3.

Parte das larvas L3 recuperadas foi utilizada para a infecção experimental, o restante foi armazenado a -20°C para a obtenção de antígenos e dos controles nos métodos moleculares.

3.3 Desenho experimental

Foram utilizados 60 ratos (*R. norvegicus*, Wistar) machos entre 4 a 6 semanas de idade, com aproximadamente 120g, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP) e mantidos no Biotério do IMT/USP. Os animais permaneceram a uma temperatura de 22 C° e a umidade do ar entre 60% e 70%, em ciclo de foto período (12h escuro, 12h claro, iniciando às 7h) em gaiolas apropriadas, alimentados com água, ração *ad libitum* (Labina da PURINA®), e maravalha previamente autoclavada.

3.3.1 Infecção experimental dos animais

Após a quantificação das larvas L3, 54 animais foram infectados subcutaneamente com aproximadamente 2000 larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Os animais foram divididos em grupos, de acordo com diferentes datas de pós-infecção (2, 5, 8, 13, 21, 28, 35, 45 e 60° dias após infecção, d.p.i.). Os controles negativos foram constituídos de seis animais livres de infecção.

Os animais infectados (grupo experimental) e negativos (grupo controle) foram eutanasiados nas diferentes datas pós-infecção e no dia zero, respectivamente. A eutanasia ocorreu em câmara de CO₂ seguida pela coleta de amostras de sangue e fezes, bem como do intestino delgado. Após estes procedimentos as carcaças foram acondicionadas em freezer (-20°C) onde permaneceram até a coleta do lixo biológico por empresa especializada da FMUSP. Todo procedimento seguiu 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.

Aos 2, 5, 8, 13, 21, 28, 35, 45 e 60° d.p.i. 6 animais foram colocados para defecar em papel toalha limpo e úmido. Parte do material fecal foi utilizada para a pesquisa de ovos, para a cultura em carvão e o restante foi armazenado para a extração de DNA. Durante os procedimentos experimentais, os ratos permaneceram individualizados em gaiolas limpas para facilitar a coleta das amostras de fezes.

3.4 Diagnóstico Parasitológico

3.4.1 Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)

A contagem dos ovos foi realizada de acordo com o método descrito por Gordon e Whitlock (1939). Em cada ponto da cinética experimental, aproximadamente 1 grama de fezes foi homogeneizado em solução saturada de NaCl (Cloreto de sódio). Uma alíquota foi retirada para preenchimento da câmara de MacMaster e após cinco minutos de repouso procedeu-se a contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) em microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão), em aumento de 10X.

3.4.2 Cultura em carvão

Parte do material fecal obtido em cada dia da cinética experimental foi cultivada pelo método de Looss (1905 apud Neves et al., 2005). Para tanto, 1 grama de fezes foi acrescida de 2 gramas de carvão animal, e misturada em um béquer com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a mistura foi colocada em um recipiente de vidro (100mL) e mantida em estufa BOD-Biochemical Oxygen Demand (TE 390, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a temperatura de 28°C durante três

dias. Após este período as larvas foram recuperadas pelo método de Rugai et al. (1954).

3.4.3 Recuperação das larvas

Após a cultura em carvão, o frasco foi coberto com gaze invertido em cálice de sedimentação, contendo água aquecida a 40-45°C, permanecendo em repouso por uma hora. O material sedimentado foi coletado com pipeta Pasteur, transferido para tubos *eppendorfs*, analisados em microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão) em aumento de 10X.

3.5 Obtenção das fêmeas parasitas e análise da fecundidade

Para a obtenção das fêmeas parasitas de *S. venezuelensis* foi utilizado o método descrito por Nakai e Amarante (2001). Após os animais serem eutanasiados o intestino delgado foi removido e colocado em placas de Petri contendo solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida os intestinos foram seccionados longitudinalmente em duodeno, jejuno e íleo, montados em uma estrutura parecida com um “varal” em pipetas Pasteur, os quais foram colocados em contato com solução salina aquecida a 30°C em cálice de sedimentação, os segmentos foram incubados em estufa BOD- Biochemical Oxygen Demand (TE 390, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 37°C por 4 horas. Findo esse período procedeu-se a contagem das fêmeas parasitas em cada segmento pela análise em microscópio Olympus CH2 (Olympus, Japão).

O índice de fecundidade foi determinado em cada dia pós-infecção ao longo da cinética experimental, com a soma do número total de ovos recuperados divididos pelo número total fêmea recuperada. Foi também realizada a contagem

dos ovos no útero de nove fêmeas parasitas recuperadas em cada d.p.i. ao longo da cinética experimental, utilizando microscópio óptico Olympus CH2 (Olympus, Japão).

3.6 Diagnóstico Sorológico

3.6.1 Preparação de extrato alcalino de *S. venezuelensis*

O extrato alcalino das larvas infectantes foi produzido conforme metodologia descrita por Machado et al. (2003). Brevemente, aproximadamente 100mg de larvas infectantes (~400.000 larvas L3) foram ressuspensas em 0,15M NaOH (1,0mL), suplementado com coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O antígeno foi obtido por sonicação, homogeneização e centrifugação 12.400 *g*/ 4°C, 5 ciclos durante 30 minutos. O conteúdo proteico foi dosado utilizando-se o método de Lowry et al. (1951), com soro albumina bovina para a construção da curva padrão. O antígeno foi dividido em alíquotas e armazenado a -20 C°.

3.6.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O diagnóstico sorológico foi realizado pela pesquisa de anticorpos da classe IgG, utilizando o teste ELISA, de acordo com Fernandes et al. (2010). Experimentos prévios foram realizados para determinar as condições ideais de soro e de conjugado. Amostras de soro foram diluídas a 1:10 e o conjugado anti-IgG de rato marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi utilizado na diluição de 1:8000. As placas de poliestireno de alta afinidade (Costar-Corning Incorporated, corning, NY, USA) foram sensibilizadas com 10µg/mL de antígeno

solúvel alcalino, e incubada *overnight* a 4°C em câmara úmida. Em seguida procedeu-se a lavagem com PBS contendo Tween 20 (PBS-T). Os soros controles e testes foram adicionados, diluídos em PBS-T contendo leite desnatado 3% (PBS-TM) e incubados por 45 minutos a 37°C. Realizou-se três novas lavagens com PBS-T, seguido da adição do conjugado anti-IgG de rato marcado com peroxidase, diluído em PBS-TM, incubado por 45 minutos a 37°C. A reação foi revelada pela adição do substrato Ortofenilenodiamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,2, em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, durante 15 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N. A absorbância foi medida em leitora de microplaca (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) no comprimento de onda de 492nm.

3.7 Diagnóstico Molecular

3.7.1 Extração de DNA das amostras de fezes

A extração de material genético das amostras de fezes foi realizada de acordo com o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®- Hilden, Alemanha), segundo instruções do fabricante. Aproximadamente 1g de material fecal foi lavado três vezes com tampão PBS 1X concentrado seguido de centrifugação. No sedimento resultante foi adicionado 0,5mL de tampão ASL. A mistura foi homogeneizada no vórtex por 15 segundos e incubada a 70°C por 5 minutos, em seguida centrifugada a 14.000 rpm e 1,2mL do sobrenadante foi transferido a um novo tubo estéril. Um tablete de Inhibitex® foi adicionado, o tubo foi novamente homogeneizado no vórtex por 1 minuto e centrifugado a 14.000 rpm pelo mesmo período. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril e este

centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Em um novo tubo contendo 15µL de proteinase K, foi adicionado 200µL do sobrenadante e mantido *overnight* a 56°C. Findo este tempo, a mistura foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos e incubada a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 200µL de etanol absoluto e homogeneizado no vórtex por 15 segundos. A amostra foi adicionada a uma coluna acoplada em um tubo coletor, sendo então centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor, sendo adicionado 500µL do terceiro tampão a coluna, seguida por centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente 500µL do terceiro tampão foi adicionado à coluna e centrifugada a 8.000 rpm por 3 minutos. Essa etapa foi repetida. Em seguida foi adicionada a coluna 100µL do tampão de eluição e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. A coluna foi colocada em um novo tubo estéril, centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos, e descartada. O DNA eluído foi distribuído em alíquotas, e armazenado a -20°C.

3.7.2 Extração de DNA das amostras de soro

A extração de material genético das amostras de soro e das larvas L3 de *S. venezuelensis* foi realizada utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®-Hilden, Alemanha). Em síntese, foi utilizado 50µL de soro seguido pela adição de 180µL de tampão de lise. Foi acrescido 20µL de proteinase K e homogeneizado no vórtex por 15 segundos, e incubada a 56°C *overnight*. Após a incubação foi acrescido 200µL do segundo tampão. Esta mistura foi homogeneizada ao vórtex por 15 segundos e incubada a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de etanol absoluto e homogeneizado no vórtex por 15 segundos. A amostra foi adicionada a uma coluna acoplada em um tubo coletor, sendo então centrifugada a 8.000 rpm

por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor. Foi adicionado 500µL do terceiro tampão a coluna e centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente 500µL do terceiro tampão foi adicionado a coluna e centrifugada novamente a 14.000 rpm por 3 minutos. Essa etapa foi repetida. Em seguida foi adicionada a coluna 100µL do tampão de eluição e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. A coluna foi colocada posta em um novo tubo estéril, centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto, e descartada. O DNA aluído foi distribuído em alíquotas, e armazenado a -20°C.

3.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.7.3.1 Controles

Como controle positivo foi utilizado amostras de DNA proveniente de larvas L3 de *S. venezuelensis*. Para o teste de especificidade do *primer* foi extraído DNA de amostras de verme adulto de *Syphacia muris* e de *Hymenolepis diminuta*. Como controle negativo foi obtido DNA de amostras de baço, de fezes e de sangue de animais não infectados. O DNA das amostras controles foram obtidos utilizando o QIAmp Mini Kit, como descrito no item 3.7.2. Para verificar a possibilidade de contaminação ambiental, foi realizado a PCR com água e *mix*.

3.7.3.2 Primers

Para a amplificação do fragmento de 340pb (característico do gênero *Strongyloides* sp) foi utilizado o *primer* gênero referente a subunidade 18S do gene do DNA ribossomal, descrito por Marra et al. (2010).

3.7.3.3 Reação de PCR

A reação foi realizada com volume final de 10 μ L, contendo 4 μ L de DNA e 6 μ L de *mix* (0,6 μ L de MgCl₂; 2,8 μ L de água de injeção; 1,0 μ L de 10xPCR; 0,5 μ L de dNTPs; 0,5 μ L de cada *primer* (*forward* e *reverse*) 0,1 μ L de *Platinum® Taq* DNA polimerase (5U/ μ L, Invitrogen, Life Technologies, Val Allen Way, Carlsbas, CA, USA). Os ciclos de amplificação foram de 5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido por 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, seguido por uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A reação de PCR foi realizada no termociclador Master cycler ep gradiente S thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

3.7.3.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram pipetados em gel de agarose 2%, sendo homogeneizados 5 μ L do produto de PCR e 2 μ L de *BlueJuice Gel Loading Buffer* (Invitrogen, Life Technologies, Val Allen Way, Carlsbas, CA, USA). A eletroforese seguiu-se em tampão TAE 1X (Invitrogen, Life Technologies, Val Allen Way,

Carlsbas, CA, USA), sob tensão elétrica de 80 Volts e corrente elétrica de 400mA por 1 hora. Foi acrescentado aos géis um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, Life Technologies, Val Allen Way, Carlsbas, CA, USA) e um controle positivo da reação. Os géis foram visualizados em fonte de luz ultravioleta e documentados por meio do sistema de captura e análise de imagens, Alphaimage 2200 (AlphaInnotech, San Leandro, CA, USA).

3.7.3.5 Teste de sensibilidade da PCR

Para avaliar a sensibilidade da PCR convencional, as larvas L3 obtidas da cultura em carvão positiva foram recuperadas, e quantificadas em 1, 10, 50 e 100. Para tanto foram preparadas lâminas de microscopia com a quantidade de larvas indicada, seguida pela lavagem com tampão de extração dentro de um tubo contendo 1g de amostra de fezes de animais livre de infecção. As lâminas lavadas foram visualizadas novamente ao microscópio óptico para garantir a eficácia do processo de lavagem. O material dos tubos foi homogeneizado e submetido à extração de DNA utilizando o Stool Mini-Kit, como descrito no item 3.7.2. Após a extração de DNA, o produto foi amplificado utilizando o *primer* gênero e analisado em gel de agarose 2%.

3.7.3.6 Reação de sequenciamento

Para o sequenciamento foi empregada a técnica derivada da metodologia de Sanger (1977), utilizando se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o kit ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA), em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems). Os produtos gerados no segundo ciclo de PCR foram inicialmente purificados usando enzima EXOSAP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e então submetidos à reação de sequenciamento para incorporação dos ddNTPs marcados. Os produtos de amplificação foram sequenciados em ambos os sentidos da fita de DNA (*sense* e *antisense*) para garantir maior confiabilidade dos resultados.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com modificações no protocolo proposto pelo fabricante. Para o sequenciamento foram utilizados 4 µL de BigDye *mix*; 2 µL de buffer 5X (200mM Tris-HCl pH 9,0 + 5mM MgCl₂); 2 µL de cada *primer* (1,6 pmol/µL); 2 µL do produto purificado e 10 µL de água Mili-Q com volume final de reação de 20 µL.

As condições da PCR de sequenciamento foram: 92°C por dois minutos; 96°C por 30 segundos; 52°C por 30 segundos, 40 vezes e extensão final de 60°C por quatro minutos. O produto de PCR de sequenciamento foi precipitado e adicionado 65 µL de solução (EDTA 125mM e etanol absoluto), seguido pela incubação de 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 60 µL de etanol ao pellet, realizando a centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Foi adicionado ao pellet 10 µL de formamida e incubação a 95°C. O produto foi resfriado em banho de gelo e submetido ao sequenciamento. As sequências geradas foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor) e comparadas com outras sequências presentes no banco de dados

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2>), utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.8 Análises estatísticas

Os resultados do número de ovos por grama de fezes foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O índice de fecundidade foi realizado no grupo de cada pico, pelo número total de ovos dividido pelo número total de fêmeas recuperadas em cada dia da cinética experimental.

A análise do ELISA foi baseada na curva ROC, considerando as amostras do grupo experimental em relação ao grupo controle, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, $p < 0,05$. Os resultados de reatividade dos soros foram expressos em média de densidade óptica (DO), foram consideradas positivas as amostras de soros com valores de DO maior que o *cut-off*.

3.9 Normas de biossegurança

Todo o procedimento de coleta, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização de equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. (2005).

4 RESULTADOS

4.1 Diagnóstico Parasitológico

Para determinar a intensidade da infecção foi utilizada a contagem de ovos por grama de fezes. No gráfico 1, está representado o número médio de ovos por gramas de fezes ao longo da cinética experimental. Pode-se observar que o dia inicial de eliminação de ovos nas amostras de fezes foi no 5º d.p.i., sendo o 8º d.p.i. o pico de maior eliminação de ovos.

Gráfico 1- Contagem média de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais infectados com *S. venezuelensis*. O valor representa a média do número de ovos dos seis animais em cada dias pós-infecção (d.p.i.).

Tabela 1 está apresentada a média do número de ovos por gramas de fezes ao longo da cinética experimental. O maior número de ovos eliminados ocorreu no 8º d.p.i. (33267) e o menor foi no 45º d.p.i. (3).

Tabela 1- O número médio de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*.

Dias pós-infecção	OPG
2º	0
5º	4833±2114,2
8º	33267±9470,9
13º	19792±3167,9
21º	8117±4356,7
28º	2042±840,5
35º	551±332,4
45º	3±3,5
60º	0

*OPG = ovos por gramas de fezes; os valores são apresentados em média $\pm$ desvio padrão dos seis animais.

Como método complementar de diagnóstico parasitológico foi realizado a cultura em carvão. A cultura em carvão foi positiva do 5º d.p.i. ao 35º d.p.i. Na Figura 3, apresenta os estágios de ovo e de larva filarioide de *S. venezuelensis*.

Figura 3- Estágios evolutivos de ovo (a) e de larva infectante (b) de *S. venezuelensis* recuperados após a realização dos métodos parasitológicos nas amostras de ratos infectados experimentalmente.

4.2 Obtenção de fêmeas parasitas e análise de fecundidade

Foi recuperado maior número de fêmeas parasitas no 8º d.p.i. (454,2), a porção do intestino delgado com maior número de fêmeas foi o duodeno (Tabela 2).

O índice médio de fecundidade das fêmeas foi determinado pelo número total de ovos recuperado dividido pelo número de fêmeas recuperadas em cada dia após infecção, sendo o maior índice encontrado no dia 21º d.p.i. (112,1) (Tabela 2).

Tabela 2- Fêmeas parasitas recuperadas no intestino delgado dos animais infectados com *S. venezuelensis* e o índice de fecundidade.

Dias pós-infecção	Porções do intestino delgado			Nº de fêmeas	Índice de Fecundidade
	D	J	I		
2º	0	0	0	0	0
5º	72±17	16,2±21,8	5,3±7,4	93,5±14,1	53,1±23,7
8º	434,8±130,3	14,8±18,7	4,5±5,7	454,2±136,7	74,4±9,2
13º	189,7±47	7,4±10,9	1,8±2,8	198,8±50,8	102,5±15,1
21º	58,5±20,6	10±15,1	1,5±1,6	70±2	112,1±40,4
28º	17,3±4,5	1,7±2,7	1,5±2	20,5±5,2	97±18
35º	3,7±3,2	0,8±1,2	0,2±0,4	4,7±9,1	74,8±71,2
45º	0	0	0	0	0
60º	0	0	0	0	0

*Porções do intestino delgado (D= duodeno, J= jejuno, I = íleo); índice de fecundidade (número total de ovos recuperados dividido pelo número de fêmeas recuperadas nos 6 animais em cada dia após infecção). Os valores estão apresentados em média ± desvio padrão.

Na tentativa de verificar a viabilidade dos ovos, foram separadas nove fêmeas parasitas em cada dia pós-infecção para realizar a contagem dos ovos presentes no útero. Foi observado que o dia 28º d.p.i apresentou maior número de

ovos no útero das fêmeas parasitas ($11 \pm 15,5$), e o menor número foi no 35º d.p.i. ($3 \pm 1,7$) (Tabela 2). No Gráfico 2, está demonstrado o número médio de ovos encontrados nas nove fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*. Na Figura 4, apresentada uma fêmea parasita adulta de *S. venezuelensis* recuperada no intestino delgado dos animais experimentais.

Gráfico 2- Número médio de ovos observados no útero das fêmeas parasitas (n=9) de *S. venezuelensis*, obtidas dos animais infectados experimentalmente.

Figura 4- Estágio evolutivo de fêmea parasita de *S. venezuelensis* obtido do intestino delgado de ratos infectados experimentalmente (a-fêmea parasita adulta e b-detalle do útero).

4.3 Diagnóstico Sorológico

4.3.1 Ensaio imunoenzimático – ELISA

Na avaliação do teste ELISA foi utilizado soros de animais infectados (n=54) e não infectados (n=6). De acordo com a análise da curva ROC, os resultados demonstraram sensibilidade de 87,4%, e especificidade de 100%, utilizando extrato alcalino de larvas L3 de *S. venezuelensis* (Figura 5).

Figura 5- Curva ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES) e área sob a curva (AUC), programa Graph Pad Prism (versão 5.0) do teste ELISA, utilizando extrato alcalino de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. A curva ROC foi obtida a partir de amostras de soro dos animais infectados em relação aos animais não-infectados.

Anticorpos anti-IgG específica para *S. venezuelensis* foram detectados a partir do 5º d.p.i., e pode-se observar que ocorreu um aumento gradativo de IgG ao longo da cinética até o 28º d.p.i. (Figura 6). Os valores de densidade óptica das

amostras de soros dos animais do grupo experimental em relação ao grupo controle estão apresentados na Tabela 3.

Figura 6– Cinética de detecção de IgG específica para larva de *S. venezuelensis* em amostras de soros de ratos experimentalmente infectados. (N) controle negativo. A linha representa o limiar de reatividade (*cut-off* = 0,138). As barras indicam a média (n=6), $p < 0,05$.

Tabela 3- Valores de densidade óptica (DO) das amostras de soros dos animais do grupo experimental (n=6).

	Dias pós-infecção									
	CN	2	5	8	13	21	28	35	45	60
Média	0,120	0,119	0,159	0,251	0,311	0,406	0,579	0,435	0,310	0,218
Desvio padrão	7,4	15,5	23,1	12,7	38,5	59,6	60,9	15,2	39,5	14,1

4.4 Diagnóstico Molecular de *S. venezuelensis*

4.4.1 Teste da sensibilidade e da especificidade do *primer* gênero

Inicialmente a reação de PCR foi realizada utilizando amostras de DNA provenientes de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (controle positivo). Para avaliar a sensibilidade, o DNA obtido a partir das amostras dos animais negativos contaminadas artificialmente com 1, 10, 50 e 100 L3 foi submetido a PCR. Pode-se observar que houve amplificação (fragmento de 340bp) em todas as amostras contaminadas com as diferentes quantidades de larvas L3 (Figura 7).

Para o teste de especificidade do *primer* foi utilizado DNA obtido de amostras de verme adulto de *S. muris* (parasita frequentemente encontrado em animais no biotério) e de verme adulto de *H. diminuta* (encontrado em um animal infectado no ciclo de manutenção da cepa de *S. venezuelensis*). Como controle negativo, foi utilizado DNA de amostras de fezes, soro e baço de animais não infectados (Figura 8). Pode-se observar que ocorreu amplificação inespecífica nas amostras provenientes de *S. muris* (fragmento de 380bp) e nas amostras negativas.

Figura 7- Amplificação de DNA, utilizando o *primer* gênero (340bp), a partir de amostras de fezes de ratos não infectados contaminadas artificialmente com 1, 10, 50 e 100 L3 de *S. venezuelensis* (1, 2, 3 e 4 respectivamente). CP (controle positivo, L3 de *S. venezuelensis*), PM (Padrão de peso Molecular, 100bp).

Figura 8- Amplificação de DNA, utilizando o *primer* gênero (340bp), a partir de amostras de vermes adultos de *S. muris* (1), vermes adultos de *H. diminuta* (2) e de amostras de fezes, soro e baço não infectado (3, 4 e 5, respectivamente). CP (controle positivo, L3 de *S. venezuelensis*), CN (controle negativo, *mix* da reação de PCR sem DNA), PM (Padrão de peso Molecular, 100bp).

Após a amplificação do DNA, os produtos obtidos a partir do controle positivo foram submetidos ao sequenciamento e a busca no banco de dados. Analisando as sequências obtidas pode-se verificar 100% de similaridade com a subunidade 18S do gene do RNA ribossomal de *S. venezuelensis* (AB453330-1, AB923887-1) (Figura 9).

```

1  TGCCTTATGCCTTCCTTGAAAAATGCATGAGTCCATTCATTTGACTCTCCTAAAGATTAA
61  GCCATGCATGTGTAAGTACAATGTTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAG
121 CTATAGACTACACGGTAAATATTTTAGTTGGATAACTGAGGTAATTCTTGAGCTAATACA
181 CGCTTTTTATACCACATTAGTGGTGC GTTTATTTGATTAAACCATTTTTTCGGTTGACTC
241 AAAATATCCTTGCTGATTTTGTTATTAACATACCGTATGTGTATCTGGTTTATCAACT
301 TTCGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGTTGTGACGGATAACGGAGAATTAGGGTTCTGA
361 CTCCGGAGAGGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATTCCAAGGAAGGCAGCAGGCAGGGGCA
421 CAACCATGGAACGATGCATGCAGCGAGGAATGCATAAGGCAGCAAAGAT

```

Figura 9- Sequência obtida após a amplificação do DNA de larva filarioide de *S. venezuelensis*, utilizando o *primer* gênero (*forward* e *reverse* estão demarcados).

4.4.2 Amplificação de DNA de *S. venezuelensis* nas amostras de fezes

O fragmento de 340bp foi detectado do 5º ao 21º d.p.i. Bandas inespecíficas de 300bp ocorreram em algumas amostras, e a banda de 420bp no final da cinética e nos animais não infectados (Figura 10).

Figura 10- Amplificação de DNA, utilizando o *primer* gênero (340bp), a partir de amostras de fezes de animais experimentalmente infectados (2, 5, 8, 13, 21, 28, 35, 45 e 60 dias pós-infecção, 1-9 respectivamente), de amostras de fezes de ratos não infectados (10). CP (controle positivo, L3 de *S. venezuelensis*), CN (controle negativo, *mix* da reação de PCR sem DNA), PM (Padrão de peso Molecular, 100bp).

4.4.3 Amplificação de DNA de *S. venezuelensis* nas amostras de soros

Em relação às amostras de soros, foi extraído DNA das amostras dos animais infectados experimentalmente e controles (Figura 11). Pode-se observar que apenas nas amostras de soros dos dias 2º, 5º e 8º pós-infecção apresentaram o fragmento de 340bp, marcado fracamente, as demais apresentaram um fragmento inespecífico (~400bp).

Figura 11- Amplificação de DNA, utilizando o *primer* gênero (340bp), a partir de amostra de baço de animal não infectado (1); L3 de *S. venezuelensis* (2), soros de animal experimentalmente infectados (2, 5, 8, 13, 21, 28, 35, 45 e 60 dias pós-infecção, 3-11 respectivamente), *mix* da reação de PCR sem DNA (12). PM (Padrão de Peso Molecular, 100bp).

4.4.4 Comparação da positividade dos métodos de diagnóstico na infecção experimental com *S. venezuelensis*

Avaliando os métodos utilizados para a detecção de *S. venezuelensis* no modelo experimental, pode-se observar a melhor performance dos métodos parasitológicos frente aos demais métodos de diagnóstico. O teste ELISA apresentou positividade até o 60º d.p.i., enquanto que a PCR (fezes e soro) apresentou amplificação específica do 2º ao 21º d.p.i. (Tabela 4).

Tabela 4- Comparação da positividade dos métodos de diagnóstico ao longo da cinética experimental, utilizando amostras de ratos infectados com *S. venezuelensis*.

Cinética Experimental (d.p.i.)	Métodos de Diagnóstico					
	Parasitológico			Sorológico	PCR	
	OPG	CC	CF		Fezes	Soro
2 ^o	-	-	-	-	-	+
5 ^o	+	+	+	+	+	+
8 ^o	+	+	+	+	+	+
13 ^o	+	+	+	+	+	-
21 ^o	+	+	+	+	+	-
28 ^o	+	+	+	+	-	-
35 ^o	+	+	+	+	-	-
45 ^o	+	-	-	+	-	-
60 ^o	-	-	-	+	-	-

5 DISCUSSÃO

A estrogiloidíase é uma infecção parasitária causada por nematódeos do gênero *Strongyloides* que podem parasitar diversos animais e também seres humanos. *S. venezuelensis* é uma espécie comumente encontrada parasitando roedores (*R. norvegicus*) e amplamente utilizada em pesquisas relacionadas com a biologia, relação parasita-hospedeiro, mecanismos de respostas imunes e no desenvolvimento de métodos de diagnóstico (Maruyama et al., 2006; Marra et al., 2011; Yasuda et al., 2014). O presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes métodos de diagnóstico de *S. venezuelensis* em ratos infectados experimentalmente.

Avaliando a cinética de eliminação de ovos ao longo da infecção, foi observado um aumento da eliminação de ovos no 8º d.p.i., seguido pelo decréscimo até o 45º d.p.i. Diversos estudos têm demonstrado resultados semelhantes ao presente trabalho, independentemente do número de larvas L3 utilizadas para a infecção e do modelo experimental escolhido. Silveira et al. (2002) verificaram um pico na eliminação de ovos no 7º d.p.i. (~17000 OPG) em ratos Wistar infectados com 1500 L3 de *S. venezuelensis*. Já nos estudos realizados por Baek et al. (2003) em ratos da linhagem Sprague-Dawley (SD) infectados via subcutânea com 1000 L3 deste nematódeo, o pico de eliminação de ovos ocorreu no 9º d.p.i. (~ 55000 OPG). Em outro estudo realizado por Islam et al. (1999) utilizando ratos Fischer (F344) e 1000 L3 de *S. venezuelensis* para a infecção detectaram que a contagem máxima de ovos nas fezes ocorreu no 9º d.p.i. De modo semelhante, ao infectar fêmeas Wistar com 500 L3 de *S. rattii*, Wilkes et al. (2007) demonstraram que a contagem média de ovos nas fezes foi mais elevada no 7º d.p.i. (~33000 OPG).

No entanto, outros autores têm demonstrado resultados diferentes dos apresentados neste estudo, nos quais relatam a ocorrência de mais de um pico de eliminação de ovos. Nakai e Amarante (2001) utilizando ratos Wistar infectados com 4000 L3 de *S. venezuelensis*, observaram três picos de eliminação de ovos, sendo o maior deles no 8º d.p.i. (96900 OPG) e dois menores no 11º (60000 OPG) e no 21º d.p.i. (35000 OPG). Ao infectar ratos Wistar com *S. ratti*, Kimura et al. (1999) demonstraram dois picos de eliminação de ovos, no 7-8º d.p.i. e outro no 25º d.p.i. Resultados semelhantes foram obtidos por Machado et al. (2008), com maiores valores de OPG registrados nos dias 7º, 8º e 11º dias após a infecção. Variações no número de ovos por gramas de fezes podem ser devidas a diferenças na distribuição dos ovos nas amostras fecais, ao padrão diurno ou noturno de postura do parasita, ao tempo de trânsito do alimento e das fezes no trato gastrointestinal, bem como à consistência das mesmas (Douch et al., 1996). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que o número de ovos recuperados é proporcional à dose do inóculo utilizado para a infecção (Tamura, 1993; Taira, 1995; Nakai e Amarante, 2001).

Considerando que o início da oviposição ocorreu no 5º d.p.i, o período pré-patente foi anterior ao relatado por Taira et al. (1995), que, ao infectarem ratos da linhagem SD com o mesmo nematódeo, verificaram que o período pré-patente variou do 6º ao 8º d.p.i.

Outra forma de avaliar a infecção por *S. venezuelensis* no modelo experimental foi à contagem de fêmeas parasitas no intestino. A contagem média de fêmeas parasitas no terço inicial do intestino delgado (duodeno) dos animais infectados foi maior do que nas outras porções (jejuno e íleo). Isto está de acordo com os resultados obtidos por Nakai e Amarante (2001), os quais verificaram que aproximadamente 70% dos nematódeos localizaram-se nos 7cm iniciais do intestino delgado dos camundongos. Resultados similares também foram obtidos

por Araújo (1967) em ratos silvestres, onde 90,8% dos parasitas estavam localizados no sexto inicial do intestino. No presente estudo, foram recuperadas fêmeas parasitas a partir do 5º d.p.i., em maior número no 8º d.p.i. e seguindo um declínio até o 35º dia pós infecção. Chiuso-Minicucci et al. (2010) demonstraram que a maior recuperação de fêmeas ocorreu na fase aguda da infecção com *S. venezuelensis*.

Em relação ao índice de fecundidade das fêmeas parasitas, foi observado um maior valor no 21º d.p.i., diferente do maior pico de eliminação de ovos nas fezes, o que pode ser explicado pela maturação dos vermes recuperados no final da cinética. Por outro lado, o número de ovos no útero das fêmeas avaliadas ao longo da cinética não teve relação com o número de OPG observado. Segundo os resultados apresentados por Nakai e Amarante (2001), o número de ovos no útero das fêmeas não teve relação com a carga parasitária, com a espécie do hospedeiro ou com o tamanho das fêmeas.

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase humana geralmente é feito por meio da detecção de larvas nas fezes. No entanto, *S. stercoralis* é um parasita intestinal de difícil diagnóstico parasitológico, devido à baixa carga parasitária e a eliminação intermitente das larvas nas infecções subclínicas (Sudré et al., 2006; Uparanukraw et al., 1999).

Na infecção experimental por *S. venezuelensis*, o diagnóstico parasitológico tem sido efetuado por meio de exame direto, cultura das fezes em carvão (Paula et al., 2013), e principalmente pela contagem de ovos nas fezes (Nakai e Amarante, 2001; Fernandes et al., 2008; Gonçalves et al., 2011). No presente trabalho a contagem de ovos por gramas de fezes foi positiva do 5º d.p.i. ao 45º d.p.i., enquanto que a cultura em carvão foi positiva somente até o 35º d.p.i. Resultados diferentes foram apresentados por Paula et al. (2013), onde a maior positividade foi da cultura em carvão em relação ao exame direto. No entanto, vale lembrar que o

método de Gordon e Whitlock (1939), tem sido o método de escolha por diversos autores para a pesquisa de ovos de *S. venezuelensis* no modelo experimental (Machado et al., 2011; Chiuso-Minicucci et al., 2010; Nakai e Amarante, 2001; Marra et al., 2010), uma vez que na infecção por *S. venezuelensis* ocorre a liberação de ovos nas fezes e não de larvas rabditoides como ocorre na espécie *S. stercoralis*.

Os métodos de cultura de um modo geral têm demonstrado grande sensibilidade (Grove et al., 1996; Requena-Méndez et al., 2013), sobretudo na presença de poucas formas do parasito, fato confirmado por Paula et al. (2013), utilizando o modelo experimental infectado por *S. venezuelensis*; e utilizando maior quantidade de fezes (10g) para a realização da cultura. A menor positividade da cultura em carvão observada no presente trabalho quando comparada ao número de OPG pode ser explicada pela redução do volume do material fecal utilizado no preparo da mesma, o que pode ter inviabilizado o desenvolvimento do parasito, mesmo seguindo a proporção de uma parte de fezes para três de carvão, como descrito por Looss (1911).

Na busca da obtenção de técnicas diagnósticas mais efetivas, a sorologia surge como uma boa alternativa no diagnóstico, não dependendo da liberação de parasitos e sim da formação de anticorpos. A aplicabilidade das técnicas sorológicas utilizando antígenos de *Strongyloides* sp tem papel fundamental no diagnóstico da estrongiloidíase humana, tanto no acompanhamento de pacientes durante o tratamento, quanto em estudos soroepidemiológicos e no esclarecimento do diagnóstico clínico (Agrawal et al., 2009; Siddiqui e Berk, 2001).

Pouco se tem discutido sobre a aplicação dos testes sorológicos como ferramenta diagnóstica da estrongiloidíase no modelo experimental. No presente trabalho avaliou-se a cinética de anticorpos IgG durante a infecção experimental por *S. venezuelensis*.

A produção de anticorpos IgG anti-*S. venezuelensis* ao longo da cinética experimental mostrou aumento gradual até diminuir no 60º d.p.i., o que pode ser explicado pela alta sensibilidade dos métodos sorológicos, que permanecem positivos por longos períodos, mesmo após a eliminação completa do parasita. Resultados semelhantes foram apresentados por Chiuso-Minicucci et al. (2010), os quais constaram que ratos Lewis infectados com *S. venezuelensis* apresentaram aumento significativo de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a) na fase de recuperação (~32º d.p.i.) em relação a fase aguda (~ 8º d.p.i.). Embora os níveis de IgE tenham permanecido elevados em ambas as fases, a sua participação no controle dessa helmintíase tem sido, pelo menos, controversa. Estudos aplicando métodos sorológicos no diagnóstico da estrogiloidíase humana demonstraram a necessidade da diferenciação entre infecção ativa e crônica (Gonzaga et al., 2011).

Diversas preparações têm sido avaliadas para a pesquisa de anticorpos específicos para o diagnóstico da estrogiloidíase humana (Feliciano et al., 2010; Gonzaga et al., 2011; Gonçalves et al., 2012a; Corral et al., 2015). No presente trabalho foi utilizado o extrato alcalino de larvas L3 de *S. venezuelensis* para a pesquisa de anticorpos no modelo experimental, assim como Gonçalves et al. (2012a,b) e Machado et al. (2011). Por outro lado, outros estudos utilizaram o extrato salino de larvas L3 para a pesquisa de anticorpos (Fernandes et al., 2008 e Chiuso-Minicucci et al., 2010).

Avaliando o teste ELISA, os dados por nós obtidos demonstraram positividade até o final da cinética (60º d.p.i.) para a pesquisa de anticorpos IgG específicos, diferentemente dos resultados obtidos por Gonçalves et al. (2012a), onde a detecção de anticorpos IgG ocorreu até o 13º d.p.i.

Como o objetivo principal de estudos com modelos experimentais é a aplicação de amostras humanas, e assim chegar a métodos de diagnósticos cada vez mais sensíveis e específicos. Gonçalves et al. (2010, 2012b) propuseram a

pesquisa de imunocomplexos e de coproantígeno utilizando amostras de ratos experimentalmente infectados, com resultados promissores. Importante ressaltar que outras abordagens do modelo experimental constantemente têm sido avaliadas em diversos estudos, como na obtenção de outras fontes de antígenos além das larvas L3 habitualmente mais utilizadas, tais como ovos e fêmeas parasitas (Gonçalves et al., 2012b), ou ainda no maior aproveitamento das fontes antigênicas de larvas L3, como a utilização de frações de membranas obtidas do *pellet* comumente descartado (Corral et al., 2015).

Técnicas moleculares vêm sendo propostas para melhorar o diagnóstico da strongiloidíase (Verweij et al., 2009; Kramme et al., 2010; Repetto et al., 2013; Sitta et al., 2014; Paula et al., 2015), porém ainda não aplicáveis na rotina laboratorial. A PCR tem sido utilizada como uma alternativa útil para a identificação de *Strongyloides* sp, permitindo assim o diagnóstico molecular (ten Hove et al., 2009; Verweij et al., 2009). No entanto a padronização de um protocolo de PCR, bem como a extração do DNA constituem o primeiro passo para se avaliar o desempenho da ferramenta molecular no diagnóstico desta helmintíase.

Para avaliar a sensibilidade do *primer* gênero foi utilizado amostras de animais não infectados contaminadas experimentalmente com larvas L3, o que demonstrou a detecção de DNA específico utilizando uma larva L3 em 1g de fezes. Resultados inferiores foram obtidos por Kramme et al. (2011), utilizando larvas de *S. ratti* para avaliar a sensibilidade de PCR em tempo real (100 larvas L3/200mg de fezes).

Para analisar a especificidade foi utilizado DNA de vermes adultos de nematódeos, *S. muris* e *H. diminuta*. Uma vez que os animais do experimento foram mantidos em biotério do tipo convencional e não em condições *germ free*, é provável que os animais pudessem estar contaminados com outros parasitas

comumente encontrado em biotérios. De acordo com Vicente et al. (1997) e Pinto et al. (2001) *S. muris* é um comum nematódeo parasita de ratos (*R. norvegicus*).

A amplificação do fragmento alvo nas amostras de fezes dos animais infectados ocorreu a partir de 5º ao 21º d.p.i. Resultados semelhantes foram apresentados por Marra et al. (2011), os quais, utilizando também o *primer* gênero, detectaram DNA parasito-específico do 6º d.p.i. até o 32º d.p.i.; é válido ressaltar que esses autores utilizaram um inóculo maior (4000L3) do que o do presente trabalho (2000L3).

À medida que a infecção evolui ocorre o aparecimento de bandas inespecíficas, sobretudo a partir do 28º d.p.i. A banda de 380bp foi detectada em algumas amostras de fezes dos animais infectados, indicando a possível contaminação dos animais com *S. muris*. Este fato já foi mencionado em alguns trabalhos (Marra et al., 2009, 2011; Paula et al., 2013). Outras bandas inespecíficas desconhecidas (200 e 300bp), já apontadas por outros autores (Marra et al., 2009), foram também amplificadas nas amostras controle e no final da cinética experimental neste estudo. Outra amplificação inespecífica do *primer* gênero foi o fragmento de 420pb, característica das amostras controle negativas. Estes resultados demonstram que este iniciador é muito sensível, porém menos específico. O aparecimento de várias bandas pode estar relacionado com a amplificação de regiões do gene de DNA ribossomal comum aos nematódeos, ou ainda pela competição durante a amplificação de DNA em amostras mistas (Marra et al., 2009).

Os resultados do diagnóstico molecular indicam que novos alvos necessitam ser estudados para que esses ensaios possam apresentar melhores resultados. Neste contexto, outro *primer* tem sido avaliado, porém com resultados inferiores de sensibilidade. Marra et al. (2009, 2011), observaram maior sensibilidade do *primer* gênero em relação ao chamado espécie-específico.

É interessante notar que a maior intensidade da banda DNA específica de *S. venezuelensis* coincide com a maior eliminação de ovos nas fezes. Resultados semelhantes foram obtidos por Verweij et al. (2007), utilizando amostras de fezes humanas para a pesquisa de DNA específico, correlacionando DNA e quantidade de ovos de parasitas eliminados nas fezes.

Levando em conta o ciclo de vida do parasito, no qual as larvas chegam até os pulmões, através da corrente sanguínea, existe a possibilidade da aplicação das técnicas moleculares em amostras de soro. Neste contexto, Marra et al. (2011) utilizando amostras de diferentes tecidos dos animais infectados, avaliaram a PCR em relação a análise histológica para a detecção específica do parasito. No presente trabalho, foi avaliada a amplificação específica de DNA a partir de amostras de soro dos animais infectados.

Foi observado, o fragmento alvo a partir do 2º ao 8º d.p.i., se for considerada a positividade da PCR no soro, pode-se notar uma menor performance em relação aos outros métodos para o diagnóstico da estrogiloidíase no modelo experimental. No entanto é importante ressaltar que a identificação de DNA pela PCR no soro foi mais precoce que a positividade dos outros métodos, fato que pode justificar a sua utilização em outros modelos, sobretudo em amostras humanas. Kramme et al. (2011) foram pioneiros a levantar a possibilidade de pesquisa de DNA de *S. stercoralis* em amostras de soro humanas.

A fase aguda e de recuperação fica bem evidente quando ocorre a contagem de ovos diariamente, porém no presente estudo foi realizada a coleta de amostras de fezes em picos definidos. Analisando a performance da PCR fezes ao longo da infecção, os presentes dados demonstram que a positividade foi no 5º até o 21º d.p.i., portanto não sendo muito sensível na fase de recuperação, definida de acordo com Chiuso-Minicucci et al. (2010) como sendo por volta do 35º d.p.i. Diferente dos resultados apresentados por Marra et al. (2011), que sugerem a PCR

como melhor escolha para o diagnóstico quando a frequência ou intensidade da infecção são baixos.

Avaliando os métodos parasitológicos, a sorologia e a análise molecular, pode-se observar a maior positividade do teste ELISA, facilmente explicado pela sua alta sensibilidade. No entanto, os elevados índices de DO no final da cinética experimental, quando os métodos parasitológicos já estão negativos, confirma a necessidade de outras avaliações uma vez que, estes valores elevados não representam uma infecção ativa. Aliado a isso, a PCR fez foi positiva, com menor aparecimento de bandas inespecíficas somente até o 21º d.p.i.

É importante mencionar a possibilidade aqui verificada da detecção de DNA do parasita em amostras de soro, o que permite vislumbrar novas abordagens que possam contribuir para o diagnóstico da estrogiloidíase humana.

6 CONCLUSÕES

- a) A avaliação do número de ovos eliminados nas fezes e a recuperação de fêmeas parasitas confirmou a evolução da infecção experimental;
- b) A contagem de ovos por grama de fezes apresentou maior positividade do que a cultura em carvão na infecção experimental por *S. venezuelensis*;
- c) A detecção de anticorpos IgG anti-*S. venezuelensis* nas amostras de soro dos animais infectados demonstrou positividade até o final da cinética experimental;
- d) A detecção de DNA específica pela PCR fezes demonstrou positividade maior do que PCR soro ao longo da cinética experimental;
- e) A identificação de DNA pela PCR soro foi anterior a positividade dos outros métodos de diagnóstico na infecção experimental por *S. venezuelensis*.

REFERÊNCIAS

- Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal VC. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2009; 103: 242- 6.
- Andersen ML. Experimentação animal. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP; 2004. p.81-119.
- Andrade-Neto JL, Assef MCV. Estrongiloidíase. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1373- 8.
- Araújo P. Distribuição de helmintos no intestino delgado de *Rattus norvegicus* naturalmente infestado. II. *Strongyloides ratti* Sanground, 1925 e *S. venezuelensis* Brumpt, 1934. **Rev Bras Cienc Farm**. 1967;1:179-90.
- Atkins NS, Conway DJ, Lindo JF, Bailey JW, Bun DY. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunol**. 1999; 21: 517- 26.
- Baek BK, Islam MK, Kim BS, Lim CW, Hur J, Oluoch AO et al. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Vet Parasitol**. 2003; 113: 217-27.
- Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N et al.. A pentaplex real time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. **Am J Trop Med Hyg**. 2011 84: 338- 43.
- Behnke JM, Lowe A, Menge D, Iraqi F, Wakelin D. Mapping the genes for resistance to gastrointestinal nematodes. **Acta Parasitol**. 2000 ;45: 1-13.
- Brasil. Diretoria Colegiada. Resolução – RDC no. 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 10 dez. 2004.
- Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Gabinete do Ministro. Portaria no 1.748, de 30 de setembro de 2011. Dispõe, no âmbito do Ministério do Trabalho e Emprego e entidades a ele vinculadas, sobre a execução da Norma Regulamentadora, de 31 de setembro de 2011, que versa sobre as diretrizes básicas para a implementação de medidas de proteção à segurança e à saúde dos trabalhadores dos serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 21 set. 2011.
- Brigandi RA, Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. *Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice. **Exp Parasitol**. 1996; 82(3):279-89.
- Brumpt E. Précis parasitology. 6. Ed. Paris: Masson et Cie; 1947.
- Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M et al. Accuracy of Five Serologic Tests for the Follow up of *Strongyloides stercoralis* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015; 9:e0003491.

Carter KC, Wilson PAG. The course of infection in rats given small primary doses of *Strongyloides ratti* and *Strongyloides venezuelensis*. **J. Helminthol.** 1989;63(2):107-14.

Centers for Disease Control, CDC. [Cited 2015 apr 10]. Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/strongyloidiasis.html>

Chiuso-Minicucci F, Marra NM, Zorzella-Pezavento SFG, França TGD, Ishikawa LLW, Amarante MRV et al. Recovery from ***Strongyloides venezuelensis*** infection in Lewis rats is associated with a strong Th2 response. **Parasite Immunol.** 2010; 32: 74–8.

Concha AR, Harrington JrW, Rogers AI. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. **J Clin Gastroenterol.** 2005; 39:203-11.

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.** 1993; 87: 173- 6.

Corral MA, Paula FM, Gottardi M, Meisel DM, Chieffi PP, Gryscek RC. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2015; 57: 77-80.

Costa-Cruz JM, Bullamah CB, Gonçalves-Pires M do R, Campos DM, Vieira MA. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 1997; 39: 313- 7.

Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DA, Sopelete MC, Campos DM, Taketomi EA. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2003; 45: 265-8.

Costa- Cruz JM. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves, DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 275-84.

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

EL-Badry AA. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. **J Egy Soc Parasitol.** 2009;39: 757-68.

Elliott DE, Summers RW, Weinstock JV. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. **Int J Parasitol.** 2007; 37; 457- 64.

Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves- Pires MDOR, Gonçalves AL, Rodrigues RM et al. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diag Microbiol Infect Dis.** 2010; 67:153-61.

Fernandes A, Pereira AT, Eschenazi PD, Schilter HC, Sousa AL, Teixeira MM et al. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunol.** 2008; 30: 139-49.

Genta RM, Schad GA, Hellman ME. *Strongyloides stercoralis*: parasitological, immunological and pathological observations in immunosuppressed dogs. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1986; 80: 34-41.

Gonçalves ALR, Silva CV, Ueta MT, Costa-Cruz JM. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Exp Parasitol.** 2010; 125:338-41.

Gonçalves ALR, Belizário TL, Pimentel JDB, Penatti MPA, Pedroso RDS, Costa-Cruz JM. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bra de Med Trop.** 2011; 44: 191-3.

Gonçalves ALR, Rocha CA, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires Mdo R, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diag Microbiol Infect Dis.** 2012a; 72: 79-84.

Gonçalves ALR, Silva CV, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Exp parasitol.** 2012b; 130: 205-8.

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.** 2011; 139: 87–92.

Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J Coun Scient Ind Re.** 1939;12:50-2.

Gordon C, Gray D, Gobert G, McManus D. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. **Mol Cel Probes.** 2011; 25:143-52.

Gottardi M, Paula FM, Corral MA, Meisel DM, Costa SF, Abdala E et al., Immunofluorescence assay for diagnosis of strongyloidiasis in immunocompromised patients. **Infect Dis.** 2015;2:1-5.

Grove DI, Blair AJ. Diagnosis of human strongyloidiasis. **Adv Parasitol.** 1996; 38:251-309.

Grove DI. Human strongyloidiasis. **Adv Parasitol.** 1996; 38:251-309.

Harkness JE. Roedores. Biologia e clínica de coelhos e roedores. São Paulo: Roca; 1993. p.238.

Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **J Immunol.** 2000;165: 4544-51.

Hira PR, Al-Ali F, Shweiki HM, Abdella NA, Johny M, Francis I et al. Strongyloidiasis: Challenges in diagnosis and management in non- endemic Kuwait. **Ann Trop Med Parasitol.** 2004; 98: 261-70.

Huq MM, Karim MJ, Sheikh H. Helminth parasites of rats, house mouse and moles in Bangladesh. **Pakistan Vet J.** 1985; 5: 143–4.

Islam MK, Matsuda K, Kim JH, Baek BK. Effects of in vitro culture methods on morphological development and infectivity of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae. **Korean J Parasitol.** 1999; 37: 13-9.

Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clin Microbiol Rev.** 2004; 17: 208-17.

Kimura E. et al. A second peak of egg excretion in *Strongyloides ratti*- infected rats: its origin and biological meaning. **Parasitology.** 1999; 119 Pt2:221-6.

Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunol.** 2004; 26(6-7): 247-64.

Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Evaluation of Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidosis. **Pak J Med Sci.** 2004; 20: 36- 40.

Kramme S, Nissen N, Soblik H, Erttmann K, Tannich E, Fleischer PM et al.. Novel real- time PCR for the universal detection of *Strongyloides spp.* **Inst Trop Med.** 2010;60:450-4.

Kramme S, Nissen N, Soblik H, Erttmann K, Tannich E, Fleischer B, et al. Novel real- time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. **J Med Microbiol.** 2011;60:454-8.

Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on imunologia and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Trop.** 2014; 135: 33-43.

Ligas JA, Kerepesi LA, Galioto AM, Lustigman NS, Nolan TJ, Schad GA, et al. Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM) -and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infect Immun.** 2003; 71: 6835-43.

Little MD. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **J Parasitol.** 1966; 52: 69-84.

Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infect Dis Clin North Am.** 1993;7: 655-82.

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 of the School of Medicine.** 1911; 4: 163- 613.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951; 193: 265-75.

Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires MR, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme- linked immunosorbent assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003;98:349-51.

Machado Capella G. Comparação da sensibilidade da técnica parasitológica (OPG) e da PCR para o diagnóstico de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis infectados experimentalmente. [monografia]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2008. p. 23- 4.

Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Silva EV, Roque-Barreira MC, et al. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* influenced by variations in temperature and time of culture. **Exp Parasitol.** 2011;127:72-9.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Rev Immunol.** 2003;3:733-44.

Marra MN. Infecção experimental de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis por *Strongyloides venezuelensis*: dinâmica da infecção, uso de PCR para detecção do parasita e caracterização da resposta imune humoral. [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2009.

Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL et al. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2010; 105: 57-61.

Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL et al. Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in Lewis rats: Comparison of histological analyses and PCR. **Exp Parasitol**. 2011;127:334- 9.

Maruyama H, Hatano H, Kumagai T, El- Malki M, Yoshida A, Ohta N. *Strongyloides venezuelensis*: heparina - binding adhesion substances in immunologically damaged adult worms. **Exp Parasit**. 2000;95:170-5.

Maruyama H, Nishimaki A, Takuma Y, Kurimoto M, Suzuki T, Sakatoku Y, et al. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**. 2006;132:1-8.

McKerrow JH, Brindley P, Brown M, Gam AA, Staunton C, Neva FA. *Strongyloides stercoralis*: Identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. **Exp Parasitol**. 1990;70:34-43.

Mineo JR, Silva DAO, Sopolete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia LER, et al. Medidas de Biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia: EDUFU; 2005.

Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G et al. Regulatory T Cell Expansion in HTLV -1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009;3:456.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Rev Serv Saúde Pública**. 1948;1:507-624.

Mota-Ferreira DML, Gonçalves-Pires MdoRF, Ferreira Júnior A, Sopolete MC, Abdallah VOS, Costa-Cruz JM. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Trop**. 2009;109:103-7.

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

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; 1990. p. 17-25.

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.** 2006;36:1185-95.

Nemetschke L, Eberhardt AG, Viney ME, Streit AA genetic map of the animal-parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Mol Bioch Parasitol.** 2010; 169: 124-7.

Neves DP, Melo AL, Genaro, Linardi PM. Diagnóstico parasitológico. In: Parasitologia Humana. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005.; p. 494.

Oliveira-Sequeira TCG, Amarante AFT. Dynamics of *Strongyloides venezuelensis* infection and relationship between fecal egg counts and parasite burden in Swiss mice. **Rev Bra Med Vet.** 2001;23:99-102.

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.** 2009;103:967-72.

Onuigbo MAC, Ibeachum GI. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1991;85:97.

Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology.** 2011;138:1331-40.

Paula FM, Gottardi M, Corral MA, Chieffi PP, Gryscek RCB. Is the agar plate culture a good tool for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in candidates for transplantation? **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 2013; 55: 291.

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.** 2015;110: 272- 4.

Pinto RM, Gonçalves L, Noronha D, Gomes DC. Worm burdens in outbred and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2001;96:133-6.

Rascoe LN, Price C, Shin SH, McAuliffel, Priest JW, Handali S. Development of Ss-NIE-1 Recombinant Antigen Based Assays for Immunodiagnosis of Strongyloidiasis. **PLoS Negl Trop Dis.** 2015; 9: e0003694.

Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Mol Bioch Parasitol.** 2002;125(1-2):73-81.

Repetto SA, Alba-Soto SD, Cazorla 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.** 2013; 126: 110.

Requena-Mendez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis** 2013; 7: e 2002.

Rey L. *Strongyloides stercoralis* e estrogiloidíase. In: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 581- 90.

Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonzaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT et al. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunol lett.** 2010; 134: 69-74.

Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. **J Vet Med Sci.** 2002; 64: 457-61.

Rodrigues RM, Sopelete MC, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2004; 99: 89-93.

Rossi CL, Takahashi EEH, Teixeira ALS, Barros-Mazon S, Trevisan RCG. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Rev Soc Bra Med Trop.** 1993; 26: 83-7.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes: modificações do método de Baermann. **Rev Inst Adolfo Lutz** 1954;14:5-8.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci.** USA. 1977.

Santos HLC. A importância do diagnóstico laboratorial da estrogiloidíase em pacientes imunossuprimidos. Niterói. [monografia] Rio de Janeiro, Universidade Federal Fluminense; 2000, p. 21-35.

Sato Y, Kobayashi J, Shiroma Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 1995;37:35-41.

Satou T, Koga M, Matsushashi R, Koike K, Tada I, Nikaido T. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third- stage larvae of *Strongyloides ratti* and *Strongyloides venezuelensis*. **Vet Parasitol**. 2002;104:131-8.

Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R et al. The value of an immunoenzymatic teste (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2001;65(4):346-50.

Schär F, Odermatt P, Khieu V, Panning M, Duong S, Muth S et al. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. **Acta Trop**. 2013;126:89–92.

Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clin Infect Dis**. 2001;33:1040-7.

Siddiqui AA, Berk SL. Strongyloidiasis. **Curr Treat Options Infect Dis**. 2003;5: 283-9.

Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2003; 98: 687- 91.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Corrêa A Jr, Teixeira MM et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infect. Immunol**. 2002;70:6263-72.

Sithithaworn P, Srisawangwong T, Tesana S, Daenseekaew W, Siththaworn 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 Hyg**. 2003; 97: 398- 402.

Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RCB, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**. 2014;28:1–6.

Stensvold CR, Lebbad M, Verweij JJ, Jespersgaard C, von Samson-Himmelstjerna G, Nielsen SS et al. Identification and delineation of members of the *Entamoeba* complex by pyrosequencing. **Mol Cel Probes**. 2010; 24: 403-6.

Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Rev Patol Trop**. 2006;35:174-84.

Sykes AM, McCarthy JS. A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. **PLoS Negl Trop Dis**. 2011;5: e955.

Taira N, Nakamura Y, Almeida MAO, Saeki H. Massive experimental infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats and absence of sudden death. **J Vet Med Sci**. 1995;57:855-8.

Tamura N. Studies on availability of *Strongyloides venezuelensis* for experimental model of strongyloidosis. **Bul. Nip. Vet. A. Sci.**1993; p.94- 6.

Takamure A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int J Parasitol**. 1995;25:907-11.

Tanideh N, Sadjjadi SM, Mohammadzadeh T, Mehrabani D. Helminthic infections of laboratory animals in Animal House of Shiraz University of Medical Sciences and the potential risks of zoonotic infections for researchers. **Iranian Red Crescent Med J**. 2010; 1 2:151–7.

ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2009;28:1045–53.

Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **Am J Trop Med Hyg**. 1999; 60: 967–73.

Vadlamudi RS, Chi DS, Krishnaswamy G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clin Molec Allergy**. 2006;4:8.

Vaiyavatjamai P, Boitano JJ, Techasintana P, Tungtrongchitr A. Immunocompromised group differences in the presentation of intestinal strongyloidiasis. **Jap J Infect Dis**. 2008;61:5-8.

Van Doorn HR, Koelewyn R, Hofwegen H, Gilis SH, Wetste YN, JC, Wismans PJ et al. Use of enzyme -linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **J Clin Microbiol.** 2007; 45: 438- 42.

Verweij JJ, Brienen EAT, Ziem J, Yelifari L, Polderman AM, van Lieshout L. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real time PCR. **Am J Trop Med Hyg.** 2007;77:685–90.

Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienen EA, Polderman AM et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2009; 103: 342- 6.

Vicente JJ, Pinto RM. Nematódeos do Brasil. Parte V: Nematódeos de mamíferos. **Rev Bras Zool.** 1997: 14:1-452.

Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clin Microbiol.** 1995; 8: 113- 30.

Wilkes CP, Bleay C, Paterson S, Viney ME. The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats. **Parasite Immunol.** 2007; 29: 339- 46.

World Gastroenterology Organization. [Cited 2014 Apr 25]. Available from: [http://www. Worldgastroenterology.org/Strongyloidiasis](http://www.Worldgastroenterology.org/Strongyloidiasis).

Yasuda K, Matsumoto M, Nakanishi K. Importance of Both Innate Immunity and Acquired Immunity for Rapid Expulsion of *S. venezuelensis*. **Front Immunol.** 2014; 19: 118.

Anexo a – Aprovação do Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 07 de dezembro de 2012.

Ilmo (a)

Dra. Fabiana Martins de Paula

(aos cuidados de Priscila Duarte Marques)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2012/152** e intitulado "Diagnóstico Molecular da Infecção por *Strongyloides venezuelensis* pela Detecção Específica de DNA em Amostras de Sangue de Ratos Experimentalmente Infectados", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Jorge Casseb
Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP