

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular em amostras de fezes de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) imunossuprimidos experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis*

LEILANE ALVES CHAVES

UBERLÂNDIA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular em amostras de fezes de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) imunossuprimidos experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Leilane Alves Chaves

Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas
Orientadora

Julia Maria Costa-Cruz
Coorientadora

UBERLÂNDIA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C512c Chaves, Leilane Alves, 1985-
2014 Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular
em amostras de fezes de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar
imunossuprimidos experimentalmente infectados por
Strongyloides venezuelensis/ Leilane Alves Chaves. – 2014.
65 p.

Orientadora: Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas.
Coorientadora: Julia Maria Costa-Cruz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Estrongiloidíase – Diagnóstico - Teses. 3.
Strongyloides venezuelensis - Teses. 4. Unidade de tratamento intensivo –
Teses. 5. Bactérias patogênicas – Teses. I. Freitas, Michelle Aparecida
Ribeiro de. II. Costa-Cruz, Julia Maria. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

*À minha coorientadora
Prof^a.Dr^a. **Julia Maria Costa-Cruz**
e agradeço-a pela oportunidade, sabedoria,
profissionalismo e apoio na execução deste trabalho*

Agradecimento especial

À minha orientadora,
Prof^a. Dr^a. Michelle A. Ribeiro de Freitas pelo incentivo, paciência, compreensão
e amizade; pelas longas horas de estudo e de bancada! Obrigada, aprendi muito
com você!

Agradecimentos

À Dr^a. Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, meus sinceros agradecimentos e admiração pela contribuição riquíssima. Obrigada por tudo!

À Dr^a. Fabiana Martins de Paula pela gentileza, cuidado, atenção, disponibilidade e simpatia em todos os momentos.

Aos docentes que fizeram parte da banca de qualificação e defesa: Profº. Dr. Alexandre Barcelos Moraes da Silveira, Profª. Drª. Raquel Borges Moroni, Profº. Dr. Sydnei Magno da Silva, Drª. Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves e Profª. Drª. Carina da Silva Pinheiro pelas contribuições.

Aos docentes do PPIPA pelo conhecimento propiciado.

À UFU, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro da pesquisa.

Aos técnicos do laboratório de Parasitologia, Marcelo Levenhagen e Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires pelo auxílio e à Juliana Miranda da Silva pela presença nos experimentos.

Às secretárias do Programa Luceleide Freitas Queiroz Damásio e Lucélia da Costa Assis pelo profissionalismo.

Aos colegas do laboratório de Sorologia e Biologia Molecular e Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses que se mostraram agradáveis e companheiros.

Aos meus amigos Edson e José Eduardo pela amizade e troca de conhecimentos.

À minha coordenadora-chefe e amiga, Benedicta A. Morales de Oliveira por ter me compreendido, apoiado e facilitado a conciliação entre estudo e trabalho.

À minha família, ao meu irmão Bruno e a todos os meus amigos pela torcida e afeto constantes.

Aos meus pais Leila e Eurípedes pelo amor incondicional e boas vibrações.

Finalmente, a Deus e à espiritualidade pela conclusão de mais uma etapa.

Sumário

Listar de abreviaturas

Listar de figuras

Listar de tabelas

Resumo

Abstract XV

1. Introdução	16
1.1 Aspectos morfo-biológicos do gênero <i>Strongyloides</i>	17
1.2 Ciclo biológico e o modo de transmissão de <i>Strongyloides stercoralis</i>	19
1.3 Epidemiologia da estrongiloidíase humana	20
1.4 Sintomatologia da estrongiloidíase humana	21
1.5 Resposta imune do hospedeiro	23
1.6 Diagnóstico da estrongiloidíase	24
1.7 Imunossupressão e ação modulatória da dexametasona	27
1.8 Modelos experimentais na estrongiloidíase	28
2. Objetivos	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1 Aspectos éticos	31
3.2 Animais	31
3.3 Obtenção de larvas filarioïdes de <i>S. venezuelensis</i>	32
3.3.1 Coprocultura pelo método de Looss	32
3.3.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola (1954) e processamento das larvas recuperadas.....	33
3.4 Imunossupressão com fosfato de dexametasona.....	34
3.5 Infecção experimental dos animais.....	34
3.6 Contagem de ovos/grama de fezes e produção do sobrenadante fecal	34
3.7 O teste ELISA para detecção de coproantígenos.....	35
3.8 Diagnóstico molecular	36
3.8.1 Animais	36

3.8.2 Extração de DNA	36
3.8.3 Quantificação de DNA das amostras	36
3.8.4 Controles	37
3.8.5 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	37
3.8.6 Reação de PCR.....	38
3.8.7 Eletroforese	38
3.8.8 Sequenciamento	39
3.8.9 Análise da sequência em banco de dados.....	40
3.8.10 Análise estatística.....	40
3.8.11 Normas de Biossegurança	40
4. Resultados	41
4.1 OPG (Contagem de Ovos por Grama de Fezes)	41
4.2 Detecção de coproantígenos pelo ELISA	42
4.3 Diagnóstico molecular – Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	42
4.4 Sequenciamento	43
4.5 Comparação da sensibilidade das técnicas de OPG, detecção de coproantígenos pelo ELISA e PCR.....	44
5. Discussão	47
6. Conclusões	53
7. Referências	54

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
<	Menor que
>	Maior que
µm	Micrômetros
1n	Carga cromossômica
2n	Carga cromossômica
3n	Carga cromossômica
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)
CBEA/UFU	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia
CEUA/UFU	Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândiaa
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	Densidade óptica
d.p.i.	Dias pós-infecção
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
g	Gramas
g/ml	Gramas por mililitros
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HTLV-1	Vírus Linfotrófico Humano tipo I
IE	Índice ELISA
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G do grupo 1
NF – Kappa α	Fator de Nuclear alfa
NF – Kappa β	Fator Nuclear beta
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina Tipo 1
IL-4	Interleucina Tipo 4
IL-5	Interleucina Tipo 5
IL-13	Interleucina Tipo 13
INF-γ	Interferon gama
Kg	Quilogramas
L1	Larvas rabditoides de primeiro estádio
L2	Larvas rabditoides de segundo estádio
L3	Larvas filarioïdes
L4	Estádio de diferenciação das larvas filarioïdes
M	Molar
mA	Miliampere
MG	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Ng/µl	Nanogramas por microlitros
nm	Nanômetros
OPD	O-fenilenodiamina
OPG	Contagem de Ovos por Grama de Fezes
Pb	Pares de Base

PBS	Solução salina tamponada de fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS contendo 0,3% de Tween 20
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
pH	Ponto hidrogeniônico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RN	Ácido Ribonucléico
s.c.	Subcutânea
TBE	Tris, Ácido Bórico e EDTA
Th2	Linfócito T helper tipo 2
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
u/ μ l	Unidade por microlitro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v/v	Volume-volume
x	Veze

Lista de figuras

- Fig. 1.** Cinética de eliminação de ovos/g de fezes de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *S. venezuelensis*..... 41
- Fig. 2.** Detecção de coproantígenos de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *S. venezuelensis*..... 42
- Fig. 3.** Perfis eletroforéticos obtidos por PCR de amostras de fezes de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *S. venezuelensis*..... 43
- Fig. 4.** Sequência do gene referente à subunidade 18S do rRNA de *S. venezuelensis* depositada no banco de dados NCBI..... 44

Lista de tabelas

Tab. 1 Par de Iniciadores para a Detecção de DNA de <i>S. stercoralis</i>	38
Tab. 2 Comparação dos métodos OPG (Contagem de Ovos por Grama de Fezes), detecção de coproantígenos pelo ELISA e bandas amplificadas na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos experimentalmente infectados por <i>S. venezuelensis</i>	46

Resumo

Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular em amostras de fezes de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) imunossuprimidos experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis*

O diagnóstico da estrongiloidíase é difícil, pois, a excreção larval é irregular e na maioria dos casos, os indivíduos são assintomáticos; a detecção de casos latentes de *Strongyloides stercoralis* em imunossuprimidos pode diminuir a morbidade e mortalidade da infecção. Assim, o aprimoramento de métodos confiáveis de diagnóstico são imprescindíveis. O objetivo do estudo foi comparar a liberação de ovos nas fezes pela técnica de Contagem de Ovos por Grama de Fezes (OPG), a detecção de coproantígenos pelo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e amplificação de bandas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional de fezes de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis*. Na cinética experimental foram utilizados os pontos 0 e 5, 8, 13 e 21 pós-infecção (d.p.i). Para o cálculo dos resultados foram utilizadas porcentagens simples e descrição dos resultados obtidos. Comparando-se o OPG, a detecção de coproantígenos pelo ELISA e a PCR, observou-se no grupo não imunossuprimido a liberação de ovos no teste OPG do dia 5 ao dia 13 p.i, sendo ausente no 21 d. p.i. Para a detecção de coproantígeno observou-se positividade de 33,3% no 5 e 8 d. p.i e de 100% no 13 e 21 d. p.i e na PCR, a presença de bandas amplificadas em todos os dias da cinética. Nos animais imunossuprimidos, 100% liberaram ovos nas fezes, no teste ELISA, 100% dos animais foram positivos e na PCR, a presença de bandas amplificadas em toda a cinética. Concluiu-se que a detecção de coproantígenos pelo ELISA e o diagnóstico por PCR podem ser ferramentas úteis para o diagnóstico em animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos. Em comparação ao OPG, a detecção de coproantígenos pelo ELISA e amplificação de bandas pela PCR mostraram mais sensíveis nos dias analisados e podem ser métodos de escolha para diagnóstico da estrongiloidíase principalmente nos casos de imunossupressão.

Palavras-chave: Estrongiloidíase, *Strongyloides venezuelensis*, coproantígeno, PCR, Imunossupressão, Diagnóstico.

Abstract

Comparison of parasitological, immunological and molecular methods in fecal samples of rats (*Rattus norvegicus* Wistar) immunosuppressed experimentally infected by *Strongyloides venezuelensis*

The diagnosis of strongyloidiasis is difficult the irregular larval excretion and in most cases, individuals are asymptomatic; detection of latent cases of *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed may decrease morbidity and mortality. In this sense, the improvement of reliable diagnostic methods is essential. The objective of the study was to compare the release of eggs in the feces by the technique of Egg counts per gram of feces (EPG), coproantigens detection by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and amplification bands by conventional (Polymerase Chain Reaction) PCR from feces of non immunosuppressed and immunosuppressed mice experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. In the experimental kinetic days 0 and 5, 8, 13, and 21 after infection p.i. were used. Comparing the EPG, coproantigens detection by ELISA and PCR, it was observed in the non immunosuppressed group the release of eggs from the EPG test day on 5 to day 13 p.i, being absent on day 21 p.i. Coproantigen positivity was observed in 33.3% 5 and 8 p.i. and 100% on days 13:21 p.i. and PCR, the presence of amplified bands was observed along the entire kinetics. In immunosuppressed animals, 100% of the released eggs in the feces, the data of the ELISA, 100% of the animals were evaluated in both positive and PCR, the presence of amplified bands during kinetics. It is concluded that detection of coproantigens by ELISA and PCR diagnosis could be useful tools for diagnosis of strongyloidiasis especially in cases of immunosuppression.

Keywords: Strongyloidiasis, *Strongyloides venezuelensis*, Coproantigen, PCR, Immunosuppression, Diagnosis

1. Introdução

O nematódeo *Strongyloides stercoralis* apresenta 52 espécies, no entanto somente duas delas foram descritas como infectantes para o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. No Brasil, a importância deste parasito como agente etiológico da estrongiloidíase foi descrita por Ribeiro da Luz em 1880 (PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996).

O médico francês Louis Normand em 1876, na França, observou primeiramente o parasito intestinal *S. stercoralis* quando examinava fezes diarreicas de soldados franceses na Conchinchina, Vietnã. O farmacêutico Bavay, classificou as formas encontradas nas fezes como *Anguillula stercoralis* (latim “*Änguillula*” = pequena enguia ou peixe longo e “*stercus*” = esterco) (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ; 2011).

S. stercoralis causa a estrongiloidíase, doença gastrointestinal, sendo o homem a principal fonte de infecção. O risco desta infecção está ligado diretamente às condições de higiene do indivíduo e o helminto pode induzir a fase crônica da doença com o estabelecimento da autoinfecção (RIBEIRO et al., 2005; WU et al., 2012).

A estrongiloidíase é causada pelo contato do indivíduo com as larvas L3 de *S. stercoralis* presentes no ambiente, podendo ser facilmente evitada pelo tratamento adequado do material fecal e tal processo, constitui um dos problemas sanitários de maior importância (BRAGA et al., 2011; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; KHIEU et al., 2014). A infecção por *S. stercoralis* apresenta distribuição mundial, com prevalência em regiões tropicais e subtropicais, com maior prevalência em regiões tropicais (PIRES; DREYER, 1993).

A parasitose humana causada por *S. stercoralis* tem assumido importância médica pelo crescente número de indivíduos acometidos. Geralmente é assintomática em hospedeiros imunocompetentes. Em casos de imunossupressão, pode tornar-se infecção disseminada ou hiperinfecção (KEISER; NUTMAN, 2004; BENINCASA et al., 2007;

MARCOS et al., 2008; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; GONÇALVES et al., 2012; IZQUIERDO et al.; 2013; BISOFFI et al., 2014).

O uso generalizado de corticoesteroides como tratamento imunossupressor, agrava o risco de complicações graves associadas a esta infecção (SCHÄR et al., 2013; SHETH et al., 2014).

1.1 Aspectos morfo-biológicos do gênero *Strongyloides*

O gênero *Strongyloides* apresenta como formas evolutivas a fêmea partenogenética parasita e de vida livre, macho de vida livre, ovos e larvas rabditoide e filarioide. Apresentam gerações de vida livre ou sexual e outra parasitária com a presença de apenas fêmeas parasitas (REY, 2011; COSTA-CRUZ, 2011).

As fêmeas partenogenéticas são parasitas, localizam-se no intestino delgado e produzem larvas rabditoides que no meio externo diferenciam-se em machos e fêmeas de vida livre. A ponta da cauda é curvada e medem aproximadamente 2 mm de comprimento. O trato digestório é simples formado por boca trilabiada, esôfago alongado, filariforme (cilíndrico, retilíneo) e ocupa cerca de um terço do comprimento do corpo. O orifício anal está localizado na extremidade posterior e em posição transversal; o órgão genital ocupa quase dois terços do parasito. A vulva está localizada no ventre no terço médio do corpo partindo para o útero que é anfidelfo. No útero, são encontrados os ovidutos que possui um número reduzido de ovos, cerca de 6 a 9 ovos em diferentes estágios de maturação que estão dispostos enfileirados (MORAES, 1948; SUDRÉ et al., 2006; VINEY; LOCK, 2007).

As fêmeas partenogenéticas quando instalam no intestino, produzem três tipos de ovos com características cromossômicas diferentes. Quando adquirem maturidade eclodem e diferenciam-se em três formas de larvas rabditoides. Os ovos triploides (3n) dão origem a larvas filarioides infectantes, os ovos diploides (2n) diferenciam-se em fêmeas de vida livre e haploides (1n) evoluem para machos de vida livre. Assim que as larvas rabditoides são eliminadas nas fezes do indivíduo infectado, elas podem seguir dois ciclos diferentes: partenogênico ou direto caracterizado pelas larvas rabditoides (3n) que, no meio externo se

desenvolvem em larvas filarioïdes infectantes (3n). O outro ciclo é o de vida livre ou indireto, no qual as larvas rabditoides (2n e 1n) desenvolvem em fêmeas e machos, respectivamente. Estas larvas são de vida livre e através da reprodução sexuada dão origem às larvas filarioïdes infectantes (L3) (GROVE, 1996; VINEY; LOCK, 2007; COSTA-CRUZ, 2011).

A fêmea de vida livre tem a porção posterior afilada, são menores que a fêmea partenogenética e medem até 1,2 por 0,07 mm em comprimento e largura respectivamente e possuem uma cutícula fina. O sistema digestório da fêmea de vida livre é simples, o esôfago é curto e rabditoide, intestino simples e ânus na extremidade posterior. A vulva está localizada na região medial do corpo. Possui útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2011).

Os machos de vida livre possuem corpo cilíndrico, com extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente. Medem aproximadamente de 0,7 a 0,9 mm de comprimento por 0,04 mm de diâmetro. A cavidade digestória é composta por esôfago rabditoide e intestino simples que termina em uma cloaca, localizada na extremidade da região posterior. O sistema reprodutor é composto pelos testículos, vesícula seminal, canais deferente, ejaculador e dois espículos copulatórios denominados gubernáculo (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011).

As larvas rabditoides (L1 e L2) são encontradas nas fezes, medem cerca de 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de largura. A porção anterior é cilíndrica e a cutícula que recobre o corpo é delgada e hialina. O sistema digestório é composto por uma boca e o esôfago é rabditoide, formado por dois bulbos um anterior alongado e cilíndrico, o outro posterior e granuloso, e entre os dois há uma porção estreita. O intestino tem a porção anterior mais estreita e termina em uma abertura anal (MORAES, 1948; REY, 2011).

A forma infectante é a larva filarioïde (L3) originada da segunda muda. As larvas filarioïdes são沿adas, finas e possuem cauda pontiaguda. Medem cerca de 0,35 a 0,5 mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de largura. O esôfago é filarioïde, o intestino é longo e estreito terminado em uma abertura anal. Neste estádio elas podem seguir duas formas de curso evolutivo: o primeiro é penetração em um hospedeiro e o segundo, a vida livre (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2011).

Ovos das fêmeas de vida livre são maiores que os ovos de fêmeas partenogenéticas. Apresentam parede translúcida que permite visualizar embrião (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

1.2 Ciclo biológico e o modo de transmissão de *Strongyloides stercoralis*

O ciclo biológico do parasito é complexo, existindo uma etapa de vida livre, denominada indireto ou sexuado e outro de vida parasitária, correspondente ao direto partenogenético ou assexuado (HUGGINS, 1971; COSTA-CRUZ, 2011).

A fase de vida livre do nematódeo *S. stercoralis* ocorre no meio ambiente, onde as larvas rabditoides (L2) necessitam de condições ótimas para desenvolverem em larvas filarioides infectantes (L3). A outra fase ocorre no interior do hospedeiro (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR et al., 2013).

O ciclo evolutivo de *S. stercoralis* inicia pela infecção de larvas infectantes L3 (filarioides), presentes no meio externo, estas penetram através da pele e pela corrente sanguínea, chegam aos pulmões, penetram nos alvéolos e diferenciam-se para L4. Seguem para traqueia e epiglote, são deglutidas atingem o trato digestivo pela via descendente e, no intestino delgado, adquirem a maturação para fêmeas partenogenéticas que são ovovivíparas, pois, libera ovos larvados que eclodem ainda no intestino (REY, 2011; PORTO et al., 2002; VINEY; LOCK, 2007; MEJIA; NUTMAN, 2012).

No intestino delgado, as fêmeas partenogenéticas liberam ovos e estes, eclodem liberando larvas no estádio L1 que migram para a intestino grosso transformando em L2 e são eliminadas pelas fezes. No meio ambiente, transformam-se em machos e fêmeas de vida livre ou em L3. Algumas larvas rabditoides ainda na luz intestinal desenvolvem em larvas L3 ocorrendo a reinfeção do indivíduo, causando infecções crônicas e duradouras caracterizando esse processo por autoinfecção (MORAES, 1948; PORTO et al., 2002; VINEY; LOCK, 2007; REY, 2011; MEJIA; NUTMAN, 2012).

A transmissão do parasito *S. stercoralis* pode ocorrer de várias formas: a autoinfecção externa, em que as larvas L1 na região perianal de indivíduos infectados diferenciam-se em L3 e penetram, completando o ciclo direto. A infecção interna, onde larvas L1 na luz intestinal de indivíduos infectados diferenciam-se em L3 e penetram a

mucosa intestinal. A autoinfecção interna pode provocar a elevação do número de parasitos no intestino e nos pulmões levando à hiperinfecção. A disseminação é encontrada em infecções onde os parasitos são encontrados em sítios ectópicos sendo relacionadas às formas graves dos casos de imunossupressão (SIDDIQUI; BERK, 2001; GONÇALVES et al., 2010; COSTA-CRUZ, 2011)

1.3 Epidemiologia da estrongiloidíase humana

A prevalência mundial de *S. stercoralis*, segundo estudos epidemiológicos, varia bastante, sendo entre 30 e 100 milhões de pessoas infectadas no mundo e é decorrente de vários fatores, principalmente idade, diferenças geográficas e sócioeconômicas (SING et al., 1999; VLADAMUD et al., 2006; BENINCASA et al., 2007; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; BUONFRATE et al., 2012).

Considera-se que as infecções parasitárias são comuns mesmo em países desenvolvidos, pois, a relação entre habitação e parasitismo confirma que as condições sócioeconômicas podem comprometer o estado de saúde pela facilidade de contaminação fecal. Assim, a melhoria nas condições sociais e sanitárias são urgentemente necessárias (JOHNSTON et al., 2003; MANGANELLI et al., 2012).

A estrongiloidíase é um desafio tanto médico quanto social sendo um risco para doença negligenciada pelas autoridades de saúde. Para a confirmação da doença, alguns dados são subestimados, uma vez que a baixa e irregular excreção das larvas dificulta o diagnóstico parasitológico (RAMANATHAN; NUTMAN, 2008; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Estudos epidemiológicos mostram a predominância da estrongilodíase entre a faixa etária de zero a 15 anos (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; COSTA-CRUZ, 2011).

De acordo com a prevalência, a estrongiloidíase é dividida em três categorias denominadas: casos esporádicos (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES; DREYER, 1993). A nível global, estima-se que entre 10% e 40% da população esteja infectada pelo parasita em países tropicais e subtropicais. Em países com poucos recursos

sócio econômicos a taxa de infecção de *S. stercoralis* possa chegar a 60% (COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR et al., 2013).

Entre os anos 1991 e 2006 cerca de 400 mortes por *Strongyloides* foram relatados por hiperinfecção. Entre 2006 e 2010, foram relatados uma estimativa de 69% de óbitos em imunodeprimidos (MANI et al., 2013). Estudos apontam que a ocorrência da estrongiloidíase em indivíduos imunocomprometidos, indivíduos hospitalizados, infectados por HIV/AIDS, portadores de câncer, alcoólatras, e transplantados assume grande importância médica (OLIVEIRA et al., 2002; MACHADO et al., 2008; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; SADJADI et al., 2013).

No Brasil, assim como em outras partes do mundo, a prevalência é bastante variável; Paula e Costa-Cruz (2011) mostraram que o país possui prevalência de 5,5% havendo uma variação de 3,9 para 7,9% entre as regiões, mas, não houve variação entre a área rural (4,8%) e urbana (5,0%). Em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, a ocorrência de infecções por parasitos intestinais em pacientes com AIDS foi de 12% infectados por *S. stercoralis* e 4% de infecções por outros helmintos. Estes dados caracterizam o país como hiperendêmico para *S. stercoralis* (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

1.4 Sintomatologia da estrongiloidíase humana

A infecção por *S. stercoralis* varia de assintomática às manifestações de extrema gravidade associada à mortalidade. As formas sintomáticas da estrongilodíase apresentam inicialmente alterações cutâneas causadas pela penetração das larvas na pele e caracterizadas por lesões maculopapulares causadas pela *larva currens*, ou *larva migrans* decorrente da penetração da larva por via cutânea no indivíduo causando uma lesão urticariforme, pruriginosa, única e ocasionalmente múltipla. As regiões mais atingidas são as áreas próximas à região perianal como a nádegas, virilha e tronco; pode ocorrer também nas extremidades do corpo e na cabeça, mas em proporções bem menores comparadas as regiões próximas a perianal (SIDDIQUI; BERK, 2001; RIBEIRO et al., 2005).

Após a penetração do parasito (ovos, larvas e parasitos adultos) na mucosa do intestino delgado, pode ocasionar alguns sintomas como a síndrome de má absorção, anorexia grave, diarreia, dor abdominal, cólicas, constipação, perda de peso, febre,

vômitos, prurido anal, hematêmese, ulceração gastrointestinal e hemorragia. A cronicidade origina formas graves de hiperinfecção e disseminação, esses quadros, quando não tratados precocemente, podem atingir letalidade de 85% (FARDET et al., 2006; BOULWARE et al., 2007; KOCZKA et al., 2012).

O conjunto de sintomas pulmonares causados pela migração de larvas para os pulmões tais como a tosse seca, dispneia, crises asmatiformes, hemorragia alveolar e edema pulmonar caracterizam a Síndrome de Loefler (MUKERJEE et al., 2003; VIJAYAN, 2009; COSTA-CRUZ, 2011; BAVA et al., 2013).

A imunossupressão relacionada ao uso de corticosteroides sistêmicos ou devido a doenças intercorrentes (HTLV-1, infecção por HIV, transplante de órgãos e outras doenças infecciosas) pode aumentar o risco de síndrome de hiperinfecção em pacientes com estrongiloidíase. As manifestações da síndrome de hiperinfecção são divididas em doença intestinal e extraintestinal (BAILEY, 1989; CELEDON et al., 1994; KEISER; NUTMAN, 2004).

A hiperinfecção ou autoinfecção acelerada resulta de uma alteração no estado imune e implica na exacerbação de sintomas gastrointestinais e pulmonares. Os sintomas gastrointestinais são associados ao íleo paralítico, diarreia, edema e hipoalbuminemia. Manifestações pulmonares incluem respiração ofegante, rouquidão, fibrilação atrial, dispneia e raramente, hemoptise (COOKSON et.al., 1972; YOSHIDA et al., 2006; MEJIA; NUTMAN; 2012).

A forma disseminada ocorre quando larvas migram para outros órgãos e sistemas. A penetração de grande número de larvas através da parede intestinal pode ser associada a organismos microbianos que estas carregam na corrente sanguínea tais como estreptococos do grupo D, Cândida, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*. O risco de sepse é aumentado especialmente em pacientes imunodeprimidos. Se não tratada, a taxa de mortalidade da doença disseminada se aproxima a 100% (DE BONA; BOSSO, 2008; MEJIA; NUTMAN; 2012).

1.5 Resposta imune do hospedeiro

As principais alterações imunológicas induzidas por infecções helmínticas são eosinofilia e produção de IgE. A resposta mediada por Th2 é associada com a proteção do epitélio intestinal em indivíduos infectados por *S. stercoralis* bem como em modelos experimentais. O parasito provoca a liberação de citocinas, tais como IL-10, que são capazes de regular as manifestações imunológicas e funcionais; em animais infectados, a inflamação alérgica evita a migração do parasito e do seu estabelecimento (FINKELMAN et al., 1994; NEGRÃO-CORREA et al., 2004; SCHILTER et al., 2010).

As respostas imunitárias induzidas por parasitos nematóides são reguladas por citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. A primeira defesa do hospedeiro contra helmintos é controlada pela produção de mediadores da inflamação como a interleucina IL-1 em associação ao fator de necrose tumoral, aos quais estimulam o aumento da produção de muco pelas células caliciformes intestinais. O aumento de níveis de IL-5 associados com eosinófilos parecem ter ligação na eliminação do parasito. A citocina IL-4 atua em sinergia com a IL-13 e regulam a mastocitose intestinal. A IL-13 tem sido associada com o controle da hiperplasia das células caliciformes e também na capacidade de eliminar os parasitos (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004; MACHADO et al., 2007).

A resposta imune inata às larvas de *S. stercoralis* em camundongos é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Do mesmo modo, *S. venezuelensis* induz um aumento de eosinófilos e células mononucleares no sangue, fluido da cavidade peritoneal e no líquido broncoalveolar (MACHADO et al., 2008; BONNE-ANNEÉ et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012).

A imunidade adquirida a *S. stercoralis*, tem sido extensivamente descrita em modelos animais pela resposta de anticorpos que reagem à infecção (KROLEWIECKI et al., 2013). As imunoglobulinas IgG e IgG1 são correlacionadas com diminuição no número de fêmeas parasitas; a IgG e IgE agem em conjunto para acelerar a expulsão de *S. venezuelensis*. Tanto em modelos experimentais como em indivíduos infectados por *S. stercoralis*, observa-se resposta Th2 associada à proteção do hospedeiro, mastocitose intestinal, produção de IgE e eosinofilia sendo que durante os primeiros três dias de

infecção, os níveis de IL-4, IL-5 e IFN- γ é maior nos pulmões (MACHADO et al., 2007; SCHILTER et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2013).

As infecções graves têm sido associadas à imunossupressão, especialmente quando há comprometimento da imunidade mediada por células Th2, como ocorre em linfomas, leucemias agudas ou crônicas, carcinomas metastáticos, síndrome nefrótica, glomerulonefrite crônica, subnutrição, alcoolismo diabetes mellitus, transplante renal, HIV, AIDS, uso de corticosteroides ou de outros imunossupressores. Os corticosteroides e seus metabólitos exercem um efeito estimulatório direto sobre as larvas intra-intestinais acelerando sua conversão (rabdoide em filarioide), favorecendo a autoinfecção ou ainda, um efeito sobre a fêmea parasita levando ao aumento da oviposição (KEISER; NUTMAN 2004; GONÇALVES et al., 2012).

1.6 Diagnóstico da estrongiloidíase

O diagnóstico clínico da estrongiloidíase é difícil, pois, além da excreção larval ser irregular, a maioria dos casos é assintomático. A detecção de casos latentes de *S. stercoralis* é de suma importância e visa diminuir a morbidade e mortalidade da infecção. A taxa de detecção dos métodos convencionais é baixa e exames repetidos de fezes ao longo de dias consecutivos, é essencial para o diagnóstico (SIDDIQUI; BERK, 2001; CONCHA et al., 2005; MOGHADDASSANI, et al., 2011; SCHÄR et al., 2014).

A triagem de pacientes assintomáticos para a infecção por *Strongyloides* é importante para prevenir a síndrome de hiperinfecção. Entre os testes disponíveis, os testes imunológicos são confiáveis em populações de áreas endêmicas e não endêmicas (KEISER; NUTMAN, 2004; COSTA-CRUZ; 2011; BAVA et al., 2013).

A estrongiloidíase disseminada é rara entre a população imunocompetente, e muito importante em indivíduos imunodeprimidos (KIA et al., 2007). Em áreas endêmicas o erro diagnóstico, o tratamento inadequado e a síndrome de hiperinfecção por imunossupressão são frequentes e contribuem para a alta taxa de mortalidade. Os métodos parasitológicos, normalmente empregados para o diagnóstico, baseados no hidro e termotropismo das larvas, são de baixa sensibilidade devido a pouca eliminação de larvas nas fezes e a seu

caráter intermitente (GONÇALVES, et al., 2010; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; MARCILLA et al., 2012; AHMAD et al., 2013).

Os métodos de coprocultura mais utilizados no diagnóstico de *Strongyloides* são o Método de Loss (carvão vegetal), cultura em placa de ágar (fezes semeadas em ágar contendo extrato de carne, cloreto de sódio e peptona), Harada & Mori (papel de filtro em tubos) e Brumpt (papel de filtro em placa de petri) (REY, 2011; COSTA-CRUZ, 2011).

O aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico imunológico representa um avanço na determinação da infecção em populações de risco como crianças, gestantes, imunossuprimidos; e nos casos de infecções leves, possibilitam a indicação do tratamento específico o que melhora a sobrevida de pacientes acometidos pela estrongiloidíase disseminada. Uma importante vantagem dos testes imunológicos, em relação aos parasitológicos, é que eles não dependem do nível de excreção larval (RIGO et al., 2008).

Os testes imunológicos são muito utilizados na rotina laboratorial no diagnóstico de *S. stercoralis*. O mais importante deles, é o teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), pela facilidade de aplicação da técnica e maior sensibilidade. No entanto, a utilização de alguns métodos, podem ter limitações; se o resultado for positivo, a análise microscópica é necessária (SIDDQUI; BERK, 2001; MARCOS et. al., 2008; MOGHADDASSANI et al., 2011). Entretanto, o teste ELISA e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) podem ser importantes tanto em diagnósticos individuais como em estudos epidemiológicos, sendo testes rápidos e de baixo custo (SATO; TOMA, 1990; RIGO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010).

Coproantígenos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de várias infecções intestinais. Em geral, os anticorpos criados contra extractos de parasitas são revestidos em placas de micropartilha e, em seguida o antígeno fecal é capturado e detectado com o mesmo ou o segundo anticorpo específico do parasito, em um ensaio de captura. A utilização de anticorpos monoclonais aumenta a sensibilidade e a especificidade de tais ensaios. A detecção de coproantígenos possibilita o diagnóstico precoce de uma parasitose, fato relevante nos casos assintomáticos e de imunossupressão. O diagnóstico da estrongiloidíase humana através da detecção de coproantígenos pode ser uma abordagem sensível e promissora, mas que necessita de mais pesquisas (GONÇALVES et al., 2010; SYKES; MACCARTHY, 2011).

Vários métodos de diagnóstico moleculares têm sido empregados e dentre eles a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser um método altamente sensível para

detectar agentes patogênicos em infecções (NUÑEZ, et al., 2001). O passo inicial para a execução da técnica de PCR é o isolamento do DNA do organismo desejado. O DNA é normalmente obtido a partir de amostras de pele, tecido, fluido cerebrospinal, sangue, urina, expectoração, fezes ou de tecido fixados em formalina; pode ser utilizado para a detecção de bactérias, vírus, fungos e parasitas, diagnóstico de doenças ou distúrbios genéticos, investigação forense e identificação histórica (SITTA, 2013).

A região 18S do gene do RNA ribossomal tem sido utilizada como alvo de análises filogenéticas de *S. stercoralis* (DORRIS et al., 2002). Com base na estrutura secundária de 18S rDNA, foram encontradas as regiões hipervariáveis (I a IV); A região IV é adequada para a diferenciação de espécies, pois os arranjos de nucleotídeos são específicos. Isolados de *S. stercoralis* de várias faixas geográficas mostraram ligeira diferença no tipo I (PUTLAND et al., 1993; DORRIS et al., 2002; HASEGAWA et al., 2009).

Pontes e colaboradores (2003), demonstraram que a PCR foi muito mais sensível do que a técnica de Kato-Katz (KATZ et al. 1972) e apresenta maior sensibilidade que os métodos parasitológicos convencionais durante infecções menos intensas, sinalizando que a PCR pode ser uma alternativa útil em relação ao método de Baermann utilizado (MARRA et al. 2010).

Em outros estudos, Verweij e colaboradores (2009) utilizaram um ensaio de PCR no qual os resultados alcançaram 100% de especificidade e alta sensibilidade. A utilização desta técnica pode facilitar o controle da prevalência e intensidade de infecções por *S. stercoralis*. Além disso, a utilização desta técnica é viável nos laboratórios de diagnóstico molecular, com um aumento de duas vezes na taxa de detecção. A tecnologia de PCR tem se tornado disponível em centros de pesquisa de países desenvolvidos. Além disso, tem a capacidade de detectar patógenos simultaneamente em um ambiente utilizando multiplex de PCR com economia de tempo, esforço e custo (VERWEIJ et al., 2009; RAYAN et al., 2012). A PCR pode ser indicada como método altamente sensível para a detecção de protozoários e helmintos (WONGRATANACHEEWIN et al., 2001; PONTES et al., 2003).

O desenvolvimento de testes altamente sensíveis para detectar casos de estrongiloidíase é importante para prevenir infecções fatais; Em um estudo, comparou-se a sensibilidade entre o método de PCR e a determinação clássica de OPG (Contagem de Ovos por Grama de Fezes) pela técnica modificada chamada de McMaster demonstrando

que os ensaios de PCR apresentaram maior sensibilidade mesmo com a carga mais baixa do parasita (MARRA et al., 2010).

O diagnóstico molecular por PCR tem evidenciado alta sensibilidade, especificidade, reproducibilidade, desenvolvimento em larga escala e menor tempo no diagnóstico. Nos últimos anos, algumas técnicas baseadas em PCR, foram desenvolvidas e utilizadas para a detecção de diferentes parasitos intestinais em amostras de fezes. A avaliação de tais técnicas são necessárias para superar as limitações dos atuais métodos de diagnóstico (WEISS, 1995; BASUNI et al., 2011; MOGHADDASSANI et al., 2011).

1.7 Imunossupressão e ação modulatória da dexametasona

Os glicocorticoides inibem a ação de IL-5 na sobrevivência dos eosinófilos, diminuem a resposta imune, inibem a ativação, proliferação e sobrevivência de células inflamatórias, como eosinófilos e mastócitos através do bloqueio das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (WALLEN et al., 1991; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004; GONÇALVES, et al., 2008).

O NF-kappa β (fator nuclear kappa β) é um regulador do sistema imunológico e pode ser um alvo para a imunossupressão mediada por glicocorticoides. O NF-Kappa α (fator nuclear Kappa α) provoca a translocação de NF- kappa β para o núcleo, diminuindo significativamente a secreção de citocinas e efetivamente, bloqueia a ativação do sistema imunológico. Devido as propriedades imunossupressoras, os glicocorticoides são muito utilizados na prática clínica (SCHEINMAN et al., 1995).

Estudos demonstraram que o uso de drogas como a dexametasona pode contribuir para a análise dos mecanismos envolvidos na utilização de *Rattus norvegicus* Wistar imunossuprimidos e experimentalmente infectados por *S. venezuelensis* (TEFÉ-SILVA et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012).

1.8 Modelos experimentais na estrongiloidíase

A utilização de *S. venezuelensis* em modelos experimentais, mantidos em roedores tem auxiliado nos estudos de biologia molecular, interação parasito – hospedeiro e fonte de antígeno para padronização de novas técnicas no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana (TAIRA et al., 1995; GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012).

Strongyloides venezuelensis possui uma rota de migração pela corrente sanguínea até os pulmões e para o intestino delgado, semelhante ao de *S. stercoralis* em humanos (SATO; TOMA, 1990). O desenvolvimento de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* ocorre no ambiente (ciclo de vida livre) e no hospedeiro (ciclo de vida parasitária). A fase parasitária inicia-se com a penetração das larvas filarioides (L3) através da mucosa e da pele e atingem a maturidade quando chegam ao intestino. O parasito *S. venezuelensis* é eliminado através das fezes do hospedeiro na forma de ovos (BRAGA et al., 2011).

Uma das principais limitações em se desenvolver testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em obter quantidades suficientes de antígenos, que permitam a sua análise. Pesquisas experimentais têm sido realizadas visando aumentar a obtenção de antígenos. Estudos já comprovaram que *S. venezuelensis* infectantes em roedores apresentam reação cruzada com os antígenos de *S. stercoralis*, o que permite utilizá-los para o diagnóstico da estrongiloidíase humana. Em camundongos e humanos, a IgG funciona de forma equivalente, evidenciando que o modelo experimental em ratos para estudar a imunidade contra *S. stercoralis* fornece informações que são comparadas com a resposta imune à infecção humana (SATO; TOMA, 1990; BONNE-ANNÉE et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012).

A infecção experimental por *S. venezuelensis* em ratos também é utilizado para detectar a ação de medicamentos na estrongiloidíase, o que permite o direcionamento quanto ao tratamento da doença em humanos e em animais. Com o intuito de contribuir para melhor ação terapêutica, a avaliação experimental em ratos parasitados pelo *S. venezuelensis* é realizada com a administração do medicamento por via oral e observação do comportamento perante larvas e vermes adultos (AMATO NETO et al., 1997).

As infecções helmínticas em modelos murinos tornaram-se importantes ferramentas para identificação de mecanismos de proteção mediada por células imunitárias efetoras

específicas frente à infecção por *S. venezuelensis*, dentre essas células pode-se destacar os mastócitos, eosinófilos e células B, fundamentais para desenvolvimento da imunidade do hospedeiro (COSTA-CRUZ et al., 1997; COSTA-CRUZ, 2011; EL-MALKY et al., 2013). Além de estimular resposta imunitária natural e adquirida em ratos, *S. venezuelensis* também tem sido utilizado para padronizar novas técnicas imunológicas para otimizar diagnóstico de estrongiloidíase humana (MARRA et al., 2010) e apresenta uma alternativa de obtenção de抗ígenos heterólogos. Além de ser uma espécie de fácil obtenção e manutenção em laboratório, apresenta bom rendimento larval em culturas de fezes utilizando-se carvão; além de minimizar o risco de infecção durante a manipulação (COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2007; GONÇALVES, et al., 2010).

Assim, tendo como modelo experimental o roedor *Rattus norvegicus*, hospedeiro natural de *S. venezuelensis*, acredita-se que a padronização e a comparação dos métodos de diagnóstico pelo OPG, detecção de coproantígenos pelo ELISA e amplificação de bandas pela PCR em amostras de fezes de roedores imunossuprimidos, coletadas em diferentes dias, represente eficiência, aplicabilidade e perspectiva no diagnóstico da estrongiloidíase.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Comparar as técnicas de OPG (Contagem de ovos por grama de fezes), detecção de coproantígenos pelo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em uma cinética de liberação de ovos nas fezes de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) não imunossuprimidos e imunossuprimidos, experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o número de ovos liberados em amostras de fezes através da técnica de OPG;
- Avaliar a detecção de coproantígenos em amostras de fezes através do ELISA utilizando anticorpo policlonal de *S. venezuelensis*;
- Avaliar a infecção experimental em amostra de fezes através da amplificação da região 18S do RNA ribossomal por PCR;
- Avaliar a eficiência e comparar os resultados dos diferentes métodos de diagnóstico utilizados na detecção do parasito.

3. Materiais e Métodos

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob os protocolos de N° 004/08 e 172/10.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae) da linhagem *Wistar* Greenman & Donaldson (1906) com aproximadamente 120g e entre 4 a 6 semanas de idade. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo CEUA e pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA/UFU) onde os ratos foram mantidos durante o período experimental.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo I (ratos não imunossuprimidos): animais selvagens infectados com *S. venezuelensis*, n=30.

Grupo II (ratos imunossuprimidos): animais imunossuprimidos com fosfato de dexametasona e infectados com *S. venezuelensis*, n=30.

Grupo III (ratos controle não imunossuprimidos): animais não infectados, n=6.

Grupo IV (ratos controle imunossuprimidos): animais imunossuprimidos com fosfato de dexametasona e não infectados, n=6.

Para cada ponto da cinética experimental (0 e 5, 8, 13 e 21 dias pós- infecção (d.p.i)), foram utilizados 6 animais. Sendo que para a padronização dos testes imunológicos foram utilizados três ratos controle não infectados e três ratos imunossuprimidos não infectados. O protocolo experimental deste estudo foi seguido de acordo com o protocolo descrito por Gonçalves et al., 2010.

3.3 Obtenção de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (Brumpt,1934) utilizada foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem é mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil e foi gentilmente cedida pela Profª. Dra. Marlene Tiduko Ueta para a infecção experimental.

As larvas rabbitoides (L1 e L2) de *S. venezuelensis* são liberadas de ovos presentes nas fezes dos ratos Wistar infectados. Essas larvas foram mantidas em cultura de carvão animal granulado por 3 dias a 28 °C, segundo Looss (IN: NEVES et al., 2005). Após este processo as L3 foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

3.3.1 Coprocultura pelo método de Looss

As fezes foram cultivadas pelo método de Looss (IN: NEVES et al., 2005) misturando-se partes iguais de fezes e carvão animal úmido. Para a mistura foi utilizado bêquer, bastão de vidro, luvas descartáveis e recipientes de plásticos descartáveis (100 mL). Os recipientes foram cobertos com gaze cirúrgica e as culturas foram colocadas em

estufa BOD - *Biochemical Oxygen Demand* (TE 390, Tecnal, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 25°C e 70% de umidade por três dias. Após este procedimento as larvas L3 foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

3.3.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola (1954) e processamento das larvas recuperadas

A recuperação das larvas filarioïdes de *S. venezuelensis* após coprocultura pelo método de Looss (IN: NEVES et al., 2005) foi baseada no método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

Cálices de sedimentação foram preenchidos com água corrente aquecida à temperatura de 40-45°C. Os recipientes de cultura foram cobertos com gaze e embocados para o interior dos cálices, de modo que a água alcançasse toda a extensão da abertura. O sistema cálice e recipiente foram mantidos em repouso por um período de 1 hora. O sedimento com larvas foi coletado com pipeta capilar longa e transferido para tubos de ensaio. Cada tubo de ensaio foi centrifugado a 1000 x g por 15 minutos e submetido a cinco lavagens em solução salina tamponada de fosfato (PBS) (0,15 M, pH 7,2), durante três minutos para retirada dos resíduos.

Após a última lavagem, o sedimento de larvas foi ressuspenso em PBS e 10 µL desta suspensão foi diluída e analisada em microscópio óptico de luz em aumentos de 100x, para contagem das larvas filarioïdes (Eclipse E200, Nikon Instruments, Melville, EUA). As larvas L3 de *S. venezuelensis* recuperadas e contadas foram utilizadas para a infecção experimental.

3.4 Imunossupressão com fosfato de dexametasona

Os ratos Wistar (120g) do grupo II e do grupo IV foram imunossuprimidos com Fosfato de Dexametasona 5 g/mL em água durante 5 dias para a supressão imune (ROMAND et al., 1998). A solução foi preparada e colocada em mamadeiras nas gaiolas e diariamente, durante o período de imunossupressão essa solução foi reposta conforme o consumo dos animais.

3.5 Infecção experimental dos animais

Após a imunossupressão e quantificação das larvas L3, o total de 30 ratos do grupo I e 30 ratos do grupo II, foram inoculados com 1500 (L3) por via subcutânea (s.c).

3.6 Contagem de ovos/grama de fezes e produção do sobrenadante fecal

Os ratos permaneceram individualizados em gaiolas para facilitar a retirada das amostras de fezes durante todos os procedimentos experimentais. Aos 0 e 5, 8, 13 e 21 d.p.i, os animais foram colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido. Em 1/3 do material fecal (aproximadamente 2g) foi realizada a pesquisa de ovos, 1/3 foi estocada a -20°C para a produção do sobrenadante fecal utilizado no teste imunológico e 1/3 foi destinada à extração de DNA.

A estimativa do número de ovos/g de fezes foi realizada segundo o método de Cornell-MacMaster (GORDON; WHITLOCK, 1939). Para a preparação do sobrenadante fecal, os espécimes congelados foram descongelados e acrescentados volume-volume (v/v)

em PBS, contendo 0,3% de Tween 20. A suspensão foi misturada em tubos e então centrifugada a 1500 x g por 30 minutos.

3.7 O teste ELISA para detecção de coproantígenos

Após a padronização do teste ELISA descrita por Gonçalves et al., (2010), a cinética de detecção de coproantígenos pelo teste ELISA foi realizada em placas de microtitulação de alta afinidade (Corning- Costar, Laboratory Sciences Company, NY, USA) sensibilizadas com 50 µL/poço de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* (40 µg/mL) em tampão carbonato bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos e então foram adicionados 50 µL das amostras de sobrenadante fecal de todas as amostras (1:8) diuídas em PBS-T.

As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50 µL do conjugado (anticorpo policlonal marcado com peroxidase) no título de 1:40 por 45 minutos a 37°C, sendo lavadas novamente e reveladas pelo substrato H₂O₂ (Merck) + o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany), após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de H₂SO₄ 2N (Merck).

A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan; Flow Laboratories, McLean VA) utilizando filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: IE = DO amostra/cut off, onde cut off foi estabelecido como a média de DO de três controles negativos acrescida de dois desvios padrões. As amostras foram consideradas positivas quanto IE > 1

3.8 Diagnóstico molecular

3.8.1 Animais

Para cada ponto da cinética experimental (0 e 5, 8, 13 e 21) foram utilizados 6 animais. Foram utilizadas um pool de amostras fecais de ratos da espécie *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae) da linhagem *Wistar* Greenman & Donaldson (1906) de cada dia da cinética experimental para a padronização do diagnóstico molecular.

3.8.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, cerca de 200mg de amostras fecais de ratos foram colocadas em um microtubo de 2 ml. Em seguida as fezes foram lavadas 2 vezes com tampão ASL (QIAamp DNA Stool Minikit) e colocadas em nitrogênio líquido. Posteriormente, seguiu-se o protocolo de extração do DNA de acordo com conforme instruções do fabricante QIAamp DNA Stool Minikit (QIAGEN®, Hilden, Germany).

3.8.3 Quantificação de DNA das amostras

As amostras tiveram sua concentração estimada por espectrofotometria utilizando o equipamento nanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer v.3.2.1 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). A estimativa de pureza da preparação foi dada pela reação da absorbância do DNA/proteína. Todas as amostras da cinética apresentaram a concentração de DNA aproximada de 100 ng/ μ L.

3.8.4 Controles

Foi utilizado como controle positivo, o DNA extraído de larvas de *S. venezuelensis* obtidas de amostras positivas de cultura em carvão (tamanho predito de 340 pb) um controle de *Syphacia muris* um helminto encontrado em intestino de roedores de laboratório (tamanho pré-dito de 380 pb) segundo Marra et al., (2010). O controle negativo foi composto do mix da reação de PCR (10 x PCR Buffer; MgCl₂; dNTPs; Iniciadores e Taq Polimerase, Invitrogen, Life Technologies), sem o produto de DNA, substituído por água destilada.

3.8.5 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Iniciadores

Foi utilizado um par de iniciadores desenhados a partir de revisões literárias (DORRIS et al., 2002) e de avaliações em banco de dados utilizando a ferramenta BLAST. O par de iniciador corresponde ao gene referente ao RNA ribossomal (Tabela 1).

Tabela 1. Par de Iniciadores para a Detecção de DNA de *S. venezuelensis*

Iniciador	Sequência	FT	TM	Ref.
	Foward			
gênero- específico	5'AAAGATTAAGCCATGCAT	340pb	60°C	Dorris et al., 2002
	Reverse: 5'GCCTGCTGCCTCCTTGG			

FT- fragmento teórico; TM –Temperatura de anelamento

3.8.6 Reação de PCR

A Reação de Polimerase em Cadeia foi realizada no volume final de 10µL, sendo 10µL do mix, contendo 1,0 µL de tampão, 0,6 µL de cloreto de magnésio, 0,5 µL de dNTPs, 0,5 µL de cada iniciador (foward e reverse) e 0,1µL de *Platinum®* Taq DNA polimerase (5U/µL, Invitrogen, Life Technologies); 100 ng do produto de DNA e água destilada para cada amostra.

Os ciclos de amplificação foram de 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação; de 60°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 30 segundos para extensão e extensão final de 72°C por 5 minutos. A reação de PCR foi realizada no termociclador Master cycler ep gradient S thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.8.7 Eletroforese

Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, contendo 2 µL de cada produto de PCR diluído em tampão de corrida

(*BlueJuice*TM Gel Loading Buffer, Invitrogen, Life Technologies). A corrida do gel seguiu-se em tampão TBE 1X (Invitrogen, Life Technologies), sob tensão elétrica de 90 volts e corrente elétrica de 400 mA por 1 hora. Um marcador de 100 pares de bases (Invitrogen, Life Technologies), um controle positivo (DNA de *S. venezuelensis*) e um controle negativo foram adicionados aos géis.

3.8.8 Sequenciamento

Para o sequenciamento foi empregado o protocolo de Sitta, (2013), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o Kit ABI PrismR BigDyeTM Terminator (Applied Biosystems). Os amplicons do segundo ciclo de PCR foram inicialmente purificados usando a enzima EXOSAP (ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit, GE Healthcare) e então submetidos à reação de sequenciamento para incorporação dos ddNTPs marcados. Foram utilizados um par de iniciadores (gênero-específico) que geraram sequências em torno de 340bp. Os amplicons foram sequenciados em ambos os sentidos da fita de DNA (sense e antisense) para garantir a confiabilidade dos resultados.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit ABI PrismR BigdyeTM Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com modificações no protocolo proposto pelo fabricante. Para o sequenciamento foram utilizados 4µl de BigDye Mix; 2 µl de buffer 5x (200mM Tris-HCl pH 9,0 + 5mM MgCl₂); 2µl de cada iniciador, 2µl do produto purificado e 10µl de água Mili-Q com volume final de reação de 20µl.

As condições da PCR de sequenciamento foram: 92°C por dois minutos, 96°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e extensão final de 30°C por quatro minutos.

O produto da PCR de sequenciamento foi precipitado adicionando 65µl de solução (EDTA 125 Mm e etanol absoluto), seguido pela incubação por 15 minutos em temperatura ambiente (TA) e centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado 60 µl de etanol 70% ao pellet, seguindo-se centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado 10 µl de formamida e seguindo incubação a 95°C. O produto foi resfriado em banho de gelo e submetido ao sequenciamento.

As amostras obtidas das larvas filarioïdes de *S. venezuelensis* e os produtos de amplificação da PCR convencional foram analisadas por sequenciamento para confirmação dos produtos esperados. As sequências geradas foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) e comparadas com outras sequências presentes no banco de dados (<http://ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2>), utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment search Tool).

3.8.9 Análise da sequência em banco de dados

A sequência foi obtida em forma de cromatograma e a edição das ambigüidades foi realizada de acordo com os resultados do seqüenciamento. A sequência parcial da amostras foi submetida a análise de homologia utilizando-se o servidor BLAS 2.0 (Basic Local Alignment Information) (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (National Institute of Health), Maryland, EUA.

3.8.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por porcentagens simples com a utilização do software Excel e descrição qualitativa dos resultados obtidos.

3.8.11 Normas de Biossegurança

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

4. Resultados

4.1 OPG (Contagem de Ovos nas fezes)

Em ratos não imunossuprimidos, observou-se que a cinética de eliminação de ovos em amostras fecais ocorreu somente nos dias 5, 8 e 13. No grupo dos animais imunossuprimidos, ocorreu ovoposição em todos os dias da cinética, sendo que, no dia 8, 13 e 21 p.i. houve elevada ovoposição (Fig. 1).

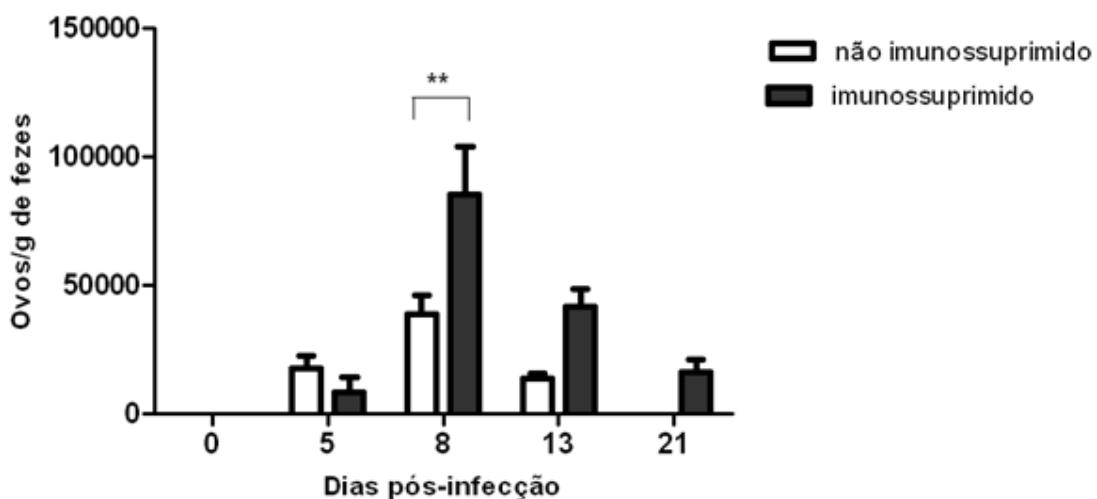


Fig. 1. Cinética de eliminação de ovos/g de fezes de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *S. venezuelensis*. ** p<0,01.

4.2 Detecção de coproantígenos pelo ELISA

A detecção de antígenos nas fezes em animais não imunossuprimidos ocorreu em toda a cinética experimental, sendo maior a detecção no dia 13 e 21 pós-infecção. Em animais imunossuprimidos a detecção de coproantígenos foi observada em toda a cinética.

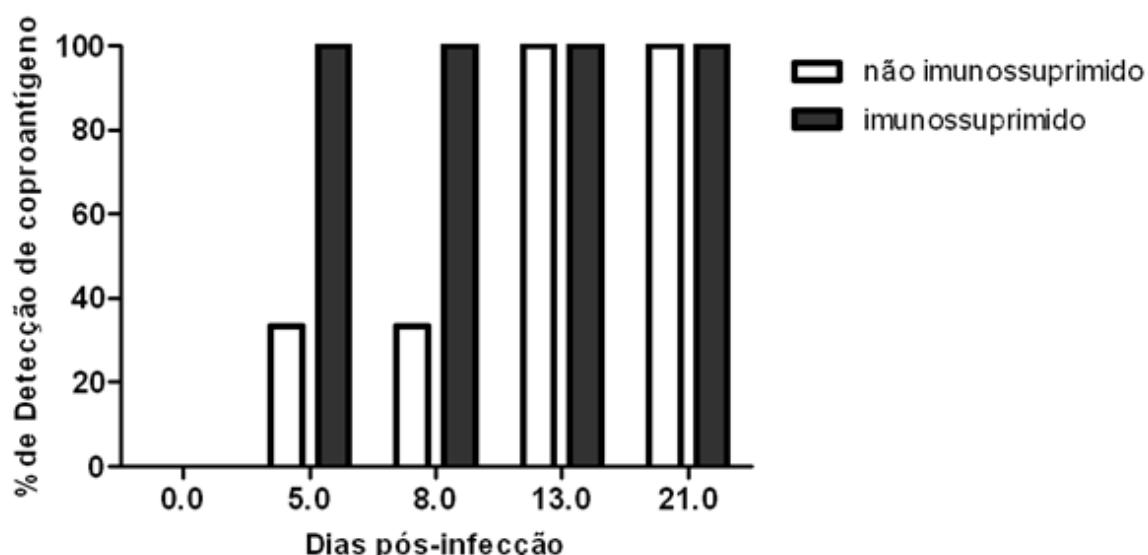


Fig. 2. Detecção de coproantígenos de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *S. venezuelensis*.

4.3 Diagnóstico molecular – Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

No ensaio de PCR, a banda de aproximadamente 405 pb corresponde ao fragmento de DNA do controle positivo obtido da larva L3 de *S. venezuelensis* e a banda de 440 pb ao fragmento de *Syphacia muris*. A banda de 480 pb corresponde ao fragmento de DNA obtido de amostra de fezes de rato não infectado. As bandas de *S. muris* e as bandas de rato não infectado foram utilizadas como controle negativo, ambas para distinguir a detecção de *S. venezuelensis*. Foram visualizadas outras bandas inespecíficas amplificadas nas amostras

fecais com utilização de *primers* gênero, pois, embora distinta do controle positivo, não foi possível associar a um parasito específico (Fig. 3).

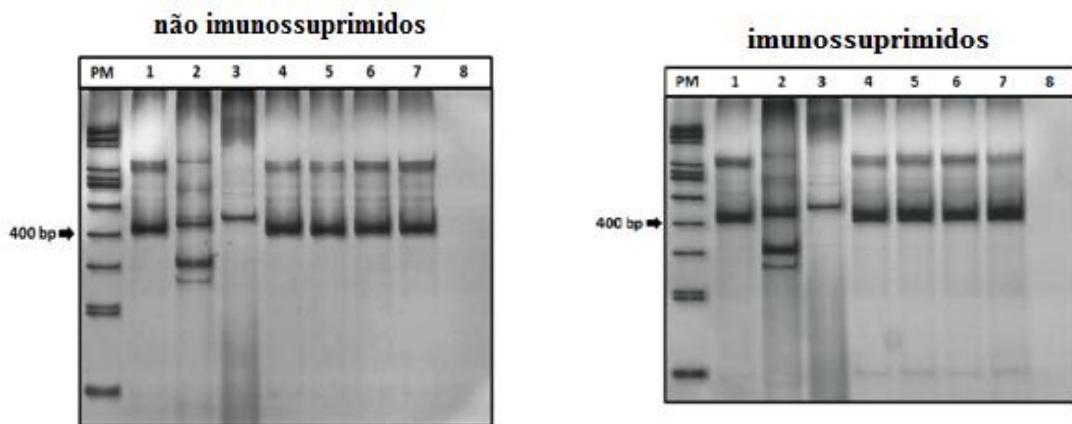


Fig. 3. Perfis eletroforéticos obtidos por PCR de amostras de fezes de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos infectados por *S. venezuelensis* respectivamente. Linha PM: 100 bp ladder (Life Technologies); linha 1: aproximadamente 405 pb (controle positivo DNA de *S. venezuelensis* L3); linha 2: aproximadamente 440 pb (*Syphacia muris*); linha 3: aproximadamente 480 pb (amostra fecal de *Rattus norvegicus* não infectados por *S. venezuelensis* e também correspondente ao dia 0); linhas (4-7): aproximadamente 405 pb (pool de DNA de amostras fecais coletadas em 5, 8, 13 e 21 dias após a infecção respectivamente). Linha 8: controle negativo (sem DNA).

4.4 Sequenciamento

A sequencia foi analisada por comparação com sequências já descritas em bancos de dados de domínio público. Através da análise das sequências de nucleotídeos foi possível a caracterização destas amostras utilizando-se os ervidores BLAST do NCBI. Este resultado pode ser visualizado através do alinhamento apresentado na fig. 4.

Sequence ID: embAJ417026.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
551 bits(298)	2e-153	319/330(97%)	1/330(0%)	Plus/Plus

Information

Range 1: 1 to 329 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Query 32 GTTTTAAACATGAAACCGGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGTAATAT 91

.....

Subjct 1 GTTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAAACAGCTATAGACTACACGGTAAATAT 60

Query 92 TTAGTTGGATAACTGAGGTAATTCTGAGGCTAACACGCTTTATACCACATTAGTG 151

[[[{"id": 1, "label": "1"}, {"id": 2, "label": "2"}, {"id": 3, "label": "3"}, {"id": 4, "label": "4"}, {"id": 5, "label": "5"}, {"id": 6, "label": "6"}, {"id": 7, "label": "7"}, {"id": 8, "label": "8"}, {"id": 9, "label": "9"}, {"id": 10, "label": "10"}, {"id": 11, "label": "11"}, {"id": 12, "label": "12"}, {"id": 13, "label": "13"}, {"id": 14, "label": "14"}, {"id": 15, "label": "15"}, {"id": 16, "label": "16"}, {"id": 17, "label": "17"}, {"id": 18, "label": "18"}, {"id": 19, "label": "19"}, {"id": 20, "label": "20"}, {"id": 21, "label": "21"}, {"id": 22, "label": "22"}, {"id": 23, "label": "23"}, {"id": 24, "label": "24"}, {"id": 25, "label": "25"}, {"id": 26, "label": "26"}, {"id": 27, "label": "27"}, {"id": 28, "label": "28"}, {"id": 29, "label": "29"}, {"id": 30, "label": "30"}, {"id": 31, "label": "31"}, {"id": 32, "label": "32"}, {"id": 33, "label": "33"}, {"id": 34, "label": "34"}, {"id": 35, "label": "35"}, {"id": 36, "label": "36"}, {"id": 37, "label": "37"}, {"id": 38, "label": "38"}, {"id": 39, "label": "39"}, {"id": 40, "label": "40"}, {"id": 41, "label": "41"}, {"id": 42, "label": "42"}, {"id": 43, "label": "43"}, {"id": 44, "label": "44"}, {"id": 45, "label": "45"}, {"id": 46, "label": "46"}, {"id": 47, "label": "47"}, {"id": 48, "label": "48"}, {"id": 49, "label": "49"}, {"id": 50, "label": "50"}, {"id": 51, "label": "51"}, {"id": 52, "label": "52"}, {"id": 53, "label": "53"}, {"id": 54, "label": "54"}, {"id": 55, "label": "55"}, {"id": 56, "label": "56"}, {"id": 57, "label": "57"}, {"id": 58, "label": "58"}, {"id": 59, "label": "59"}, {"id": 60, "label": "60"}, {"id": 61, "label": "61"}, {"id": 62, "label": "62"}, {"id": 63, "label": "63"}, {"id": 64, "label": "64"}, {"id": 65, "label": "65"}, {"id": 66, "label": "66"}, {"id": 67, "label": "67"}, {"id": 68, "label": "68"}, {"id": 69, "label": "69"}, {"id": 70, "label": "70"}, {"id": 71, "label": "71"}, {"id": 72, "label": "72"}, {"id": 73, "label": "73"}, {"id": 74, "label": "74"}, {"id": 75, "label": "75"}, {"id": 76, "label": "76"}, {"id": 77, "label": "77"}, {"id": 78, "label": "78"}, {"id": 79, "label": "79"}, {"id": 80, "label": "80"}, {"id": 81, "label": "81"}, {"id": 82, "label": "82"}, {"id": 83, "label": "83"}, {"id": 84, "label": "84"}, {"id": 85, "label": "85"}, {"id": 86, "label": "86"}, {"id": 87, "label": "87"}, {"id": 88, "label": "88"}, {"id": 89, "label": "89"}, {"id": 90, "label": "90"}, {"id": 91, "label": "91"}, {"id": 92, "label": "92"}, {"id": 93, "label": "93"}, {"id": 94, "label": "94"}, {"id": 95, "label": "95"}, {"id": 96, "label": "96"}, {"id": 97, "label": "97"}, {"id": 98, "label": "98"}, {"id": 99, "label": "99"}, {"id": 100, "label": "100"}]]

Subject 61 TTTAGTNGGATAACCGATGTAATTCTGAGCTAATACACGCTTTATACCACATTAGTG 120

Query 152 GTGCGTTATTGATTAACCATTTTCGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGATTGT 211

1000 2000 3000 4000 5000 6000 7000 8000 9000 10000

616 TATTTTACGTCGGCTATCTCTATCTCGCTTATCTAAGCTTCCGCTTGCTTACGGCTTTCGGCT 671

14 of 15 | Page

Subjct 181 TATTTAAACATACCGTATGTGTATCTGGTTATCAACTTCGATGGTAGGGTATTGGCCT 240

Querry 272 ACCATGGTGTGACGGATAACGGAGAATTAGGGTTCGACTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAA 331

2000-2001
2001-2002
2002-2003
2003-2004
2004-2005
2005-2006
2006-2007
2007-2008
2008-2009
2009-2010
2010-2011
2011-2012
2012-2013
2013-2014
2014-2015
2015-2016
2016-2017
2017-2018
2018-2019
2019-2020
2020-2021
2021-2022
2022-2023
2023-2024

Query 332 ACGGCTTACCAACATCCAAGGAAGGCAGCAGG 361

Sbjct 301 ACGGCT-CCACATCCAAGGAANGCAGCAGG 329

Fig. 4. Sequência do gene referente à subunidade

Fig. 4. Sequência do gene referente à subunidade 18S do rRNA de *S. venezuelensis* depositada no banco de dados NBCI.

4.5 Comparação da sensibilidade das técnicas de OPG, detecção de coproantígenos pelo ELISA e PCR

Comparando-se o OPG, a detecção de coproantígeno pelo ELISA e a PCR utilizando o *primer* genérico, observou-se no grupo não imunossuprimidos, a liberação de ovos no teste OPG do dia 5 ao dia 13 p.i. em todos os animais, sendo ausente no dia 21 p.i. Para a detecção de coproantígeno, observou-se positividade de 33,3% nos dias 5 e 8 p.i e de 100% nos dias 13 e 21 p.i e na PCR, a presença de bandas amplificadas em todos os dias da cinética.

No grupo dos animais imunossuprimidos, 100% dos animais liberaram ovos nas fezes do dia 5 ao dia 21 p.i. Da mesma forma, os dados do teste ELISA, onde 100% dos animais avaliados foram positivos nos dias da cinética experimental corroborando com a presença de bandas amplificadas na PCR observadas em toda a cinética de infecção.

A tabela 2 sumariza a comparação entre os métodos parasitológico, imunológico e molecular em amostras fecais de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*.

Tabela 2. Comparação dos métodos OPG (Contagem de Ovos nas Fezes), detecção de coproantígenos pelo ELISA e bandas amplificadas na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de ratos não imunossuprimidos e imunossuprimidos experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*.

Dias pós-infecção	OPG	Coproantígenos	PCR
Não imunossuprimidos			
0	-	-	-
05	+	+	+
08	+	+	+
13	+	+	+
21	-	+	+
Imunossuprimidos			
0	-	-	-
05	+	+	+
08	+	+	+
13	+	+	+
21	+	+	+

Resultado positivo: + Resultado negativo: -

5. Discussão

A estrongiloidíase é responsável por infecções crônicas assintomáticas em imunocompetentes e em pacientes imunossuprimidos, tem assumido importância médica pelo crescente número de óbitos e indivíduos acometidos (KEISER; NUTMAN, 2004; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; BISOFFI et al., 2014). A detecção de *S. stercoralis* pelos métodos convencionais é dificultada pela intermitência do padrão de excreção larval; assim sendo, a combinação de outros métodos de diagnóstico são alternativas necessárias (SIDDIQUI; BERK, 2001; GONÇALVES et al., 2012; PAULA et al., 2013).

Os procedimentos experimentais descritos mostraram que, em ratos não imunossuprimidos, o diagnóstico parasitológico pelo OPG foi negativo no final da cinética, porém, observou-se positividade na detecção de coproantígenos pelo ELISA e bandas amplificadas pela PCR em toda a cinética. A diminuição da ovoposição na contagem de ovos no final da cinética experimental pode estar associada à baixa carga parasitária em animais não imunossuprimidos. Estes dados foram semelhantes aos apresentados por Nakai; Amarante (2001) e Paula et al., (2013) que referiram o pico de eliminação das larvas nos dias 6 e 7 após a infecção, confirmando que a taxa de detecção dos métodos parasitológicos é baixo e limitado, pois, a eliminação larval é inconstante e irregular (SIDDIQUI; BERK, 2001; MACHADO et al., 2008; MOGHADDASSANI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012).

Em ratos imunossuprimidos, os resultados obtidos no OPG nos dias 5, 8, 13 e 21 p.i. coincidiram com a detecção de coproantígenos e bandas amplificadas pela PCR, sugerindo neste grupo, a susceptibilidade à infecção por *S. venezuelensis*, uma vez que, a imunossupressão causada por glicocorticoides inibe a ativação, proliferação e sobrevivência de células inflamatórias como eosinófilos e mastócitos através de bloqueio das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 envolvidas em respostas às infecções helmínticas (WALLEN et al., 1991; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004; GONÇALVES et al., 2010).

A falha no diagnóstico da estrongiloidíase é refletida nos casos associados à hiperinfecção e disseminação ocasionadas em decorrência de imunossupressão ou em indivíduos submetidos à terapia por corticoesteroides. Os métodos sorológicos e moleculares podem apresentar uma boa alternativa para o diagnóstico precoce e,

consequentemente, avaliar a eficácia de tratamento e levantar dados epidemiológicos (PAULA, COSTA-CRUZ, 2011).

A combinação de vários diagnósticos parasitológicos, imunológicos e moleculares é imprescindível para aumento da confiabilidade de técnicas utilizadas na detecção de *Strongyloides* a fim de nortear os aspectos epidemiológicos e novas políticas de controle do parasito em indivíduos em imunossupressão. A ocorrência de *S. stercoralis* no estado de Minas Gerais, Brasil, diagnosticado por testes parasitológicos foi de 33,3% em alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002). Em diferentes tipos de imunossupressão (câncer, HIV/AIDS e transplantados) o diagnóstico parasitológico foi 2,41% e 11,92% diagnosticados por técnicas imunológicas (PAULA et al., 2000). A ocorrência do parasito em indivíduos acometidos por câncer gastrointestinal, foi de 9,1% por técnicas parasitológicas e 24,2 % por técnicas sorológicas (MACHADO et al., 2008), para HIV, 12%, AIDS, 9,75% por técnicas parasitológicas e fluorescência (SILVA et al., 2005).

Ressalta-se que os sintomas gastrointestinais em imunossuprimidos, como por exemplo, a diarreia grave, pode ser associada à imunossupressão (terapia anti-retroviral, tolerância imunológica, fatores de patogenia, infecções oportunistas, etc) e à ocorrência de vários parasitos entre eles, *S. stercoralis* que, nem sempre é detectado. No entanto, é necessária uma vigilância contínua e específica de enteroparasitas na população estudada (ROSSIT et al., 2009).

Detectar coproantígenos nas fezes pode ser um método altamente sensível e específico no diagnóstico da estrongiloidíase, comprovado em 33,3% nos dias 5 e 8 p.i e 100% de positividade nos dias 13 e 21 p.i. no grupo dos ratos não imunossuprimidos. Em animais em risco à infecção grave, observou-se positividade de 100% em todos os dias da cinética. Análises semelhantes foram apresentados por Gonçalves et al., (2010) em que o modelo de imunossupressão foi eficaz com base na quantidade e tempo de eliminação de ovos em ratos imunossuprimidos. A proposta do diagnóstico de coproantígenos com a utilização de anticorpo policlonal anti *S. ratti* também foi estudada por Nageswaran et al., (1994); Sykes; McCarth (2011). Estes dados revelaram um potencial para o desenvolvimento de um Kit para detecção rápida de coproantígenos, financeiramente viável (GONÇALVES et al., 2010; SYKES; MCCARTTH, 2011).

A aplicação de coproantígenos tem sido utilizada tanto no diagnóstico da estrongilodíase quanto no diagnóstico de uma variedade de infecções intestinais como, por exemplo, amebíase, gastroenterite viral e bacteriana, infecção por trematódeos e cestódeos;

também tem sido aplicado na detecção de adenocarcinoma gástrico e pesquisa de sangue oculto nas fezes. Outra vantagem de tais ensaios é a capacidade de detectar infecções no período pré-patente (SYKES; MCCARTTH, 2011). As imunoglobulinas heterológas possuem uma excelente imunogenicidade, uma vez que, os anticorpos da classe IgG são compostos por quatro cadeias polipeptídicas, em que duas são cadeias leves e apresentam peso molecular de aproximadamente 25000 Dalton e duas são cadeias pesadas e apresentam peso molecular de 50000 Dalton, sendo portanto, ótimos imunógenos (EDELMAN; POULIK, 1961; NUNES et al., 2009).

Os testes moleculares e a sensibilidade da PCR têm sido amplamente documentados na literatura, pois, permite a geração exponencial de cópias de sequências específicas a partir de um DNA molde, por meio de uma síntese enzimática *in vitro* e assume um importante papel na epidemiologia, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças parasitárias (DE CARLI, 2001; MARRA et al., 2010).

Em estudos recentes de padronização do diagnóstico molecular de *S. venezuelensis* em fezes de roedores, tem-se notado vários resultados falso-negativos, pois, o tempo e as condições de armazenamento também são fatores importantes para o isolamento de DNA a partir de amostras de fezes. O DNA de helmintos pode degradar facilmente, pois, são particularmente vulneráveis aos fatores ambientais. Assim, é importante extrair rapidamente o material genético de amostras de fezes frescas ou que estejam adequadamente armazenadas. Sendo assim, faz-se necessário determinar as melhores condições de armazenamento do DNA de parasitos, com intuito de superar as limitações dos atuais métodos de diagnóstico moleculares em fezes (HUNT, 2011; SITTA, 2013).

A qualidade da extração de DNA é fundamental para o sucesso na interpretação dos resultados. A extração deve ser um método simples e prático, mas que, obtenha DNA altamente purificado (HUNT, 2011), além de ser cuidadosamente selecionado com especial atenção ao tipo de amostra clínica (MCORIST et al., 2002). A presença de inibidores nas fezes interfere na interação entre o DNA e a DNA polimerase, causam a degradação do DNA podendo reduzir a sensibilidade do PCR em até 1000 vezes; estes inibidores tem relação direta com a extração de DNA (HUNT, 2011; SITTA, 2013).

Na extração de DNA de *S. venezuelensis* deste estudo, foi utilizado o protocolo do Stool-kit, sendo este, a melhor escolha de acordo com a análise de vários kits de extração analisados por SITTA, (2013). Para um melhor resultado, as amostras foram armazenadas em etanol 70%, lavagem em tampão fosfato e em seguida, incubação com proteinase K

durante 12 horas e posteriormente, seguiu-se o protocolo proposto por QIAamp DNA Stool Minikit. Estes procedimentos tiveram como objetivo favorecer a homogeneização das amostras, minimizar os possíveis inibidores presentes nas fezes e obter uma amplificação ótima do fragmento esperado.

Na análise molecular pela PCR, a região 18S do gene do RNA ribossomal tem sido utilizada como alvo de análises filogenéticas presente em células eucarióticas e as sequências estão disponibilizadas em banco de dados de parasitas intestinais (DORRIS et al., 2002). A escolha da região alvo do DNA para o desenho de iniciadores utilizados na PCR é importante, pois, é um dos principais fatores para se estabelecer a alta sensibilidade e especificidade da reação, além de ser instrumento de diferenciação de espécies (PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009; SITTA, 2013).

No resultado molecular, um fragmento amplificado de DNA de *S. venezuelensis* com aproximadamente 405 pb, correspondeu ao controle positivo do DNA de larva L3 de *S. venezuelensis*. Este fragmento também foi amplificado no pool de amostras fecais nos dias 5, 8, 13 e 21 após a infecção experimental em animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos. Pode-se notar que, os resultados obtidos da amplificação para animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos, apresentaram um maior fragmento de todas as bandas amplificadas um pouco acima do esperado em relação aos tamanhos pré-ditos, uma vez que, Marra e colaboradores (2010) descrevem os fragmentos em tamanhos menores visualizados em gel de agarose. Optou-se neste estudo, a eletroforese em gel de poliacriliamida, sendo este muito sensível e utilizado a fim de obter melhores resultados na visualização de bandas em maior resolução. No entanto, por ser denso, pode limitar a corrida das amostras (Vianna, 2006). Então, para maior confiabilidade dos resultados da amplificação, foram avaliados os iniciadores do gênero-específico referente ao gene RNA ribossomal de *S. stercoralis* através de sequenciamento em que verificou-se a sensibilidade dos iniciadores, ao qual confirma que os mesmos são marcadores moleculares dentro do gênero *Strongyloides* sp. (VERWEIJ et al., 2009; SITTA, 2013).

Além da banda específica de *S. venezuelensis* do *primer* gênero, foram observados outras bandas inespecíficas, relacionadas a um nematódeo de ratos, *S. muris* e à outros contaminantes presentes nas fezes. Sabe-se que o *primer* gênero é bastante sensível, possibilitando a amplificação fragmentos com diferentes pesos moleculares no material fecal. Portanto a presença dessas bandas inespecíficas já era esperado, devido ao *primer*

utilizado não ser específico de *S. venezuelensis*, corroborando com resultados obtidos por Marra et al., (2010).

Os autores Nakai; Amarante (2001) e Marra et al., (2010) sugeriram que a PCR realizada com o *primer* gênero pode ser uma metodologia muito sensível para detecção de *S. venezuelensis* em fezes de ratos infectados com baixa carga parasitária. Paula et al., (2013) demonstraram que detecção de *S. venezuelensis* em amostras fecais apresentou sensibilidade no ensaio de PCR em comparação aos métodos parasitológicos até 68º dia pós-infecção. Entretanto, é necessária a padronização de novas técnicas moleculares que facilite a execução da técnica de PCR e na redução de custo.

Neste estudo, os dados obtidos no OPG comparado com a detecção de coproantígenos pelo ELISA foram similares às análises realizadas por Gonçalves et al., (2010) no diagnóstico de *S. venezuelensis* e similares no diagnóstico de outras helmintíases por Gordon et al., (2012) e Brockwell et al., (2013). A detecção de coproantígenos e a PCR também mostraram ferramentas positivas utilizadas no diagnóstico de *Entamoeba histolytica* por Santos et al., (2007) e Freitas, (2007). Em comparação com testes parasitológicos, a alta sensibilidade da PCR na detecção de *Opisthorchis viverrini* foi observada por Wongratanacheewin et al. (2001), *Leishmania* por Pereira-Chioccola (2009) e na detecção de *S. venezuelensis* por Marra et al., (2010). Para Moghaddassani et. al., (2011), a PCR convencional foi 100% sensível em comparação ao PCR-Nested e a coprocultura na detecção de *S. stercoralis*. No diagnóstico da leishmaniose visceral canina, 100%, 85,7% e 28,6% encontravam-se positivos, respectivamente, pela PCR, ELISA e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (QUEIROZ et al., 2010). Os autores pontuam que, a associação de técnicas de diagnóstico aumenta os níveis de positividade e contribui para o controle de parasitoses humana e animal (QUEIROZ et al., 2010).

Os dados dos estudos relatados são correspondentes aos nossos resultados, ou seja, a alta confiabilidade e sensibilidade para detecção de coproantígenos e para a PCR no grupo de animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos experimentalmente infectados por *S. venezuelensis*.

A aplicação de novas tecnologias no diagnóstico da estrongiloidíase pode facilitar a detecção de casos que participam na manutenção do ciclo em regiões endêmicas. Os resultados indicaram alternativas a serem utilizadas em inquéritos epidemiológicos voltados para diagnóstico da estrongiloidíase em indivíduos não imunossuprimidos em infecção crônica/assintomática, diagnóstico precoce antes do surgimento de

hiperinfecção/disseminação em imunossuprimidos e consequentemente, auxílio e avaliação da eficiência do tratamento da estrongiloidíase.

6. Conclusões

- Nos três métodos utilizados: OPG, detecção de coproantígenos pelo ELISA e PCR, as amostras de fezes revelaram-se importantes amostras biológicas a serem investigadas para fins de diagnóstico;
- O OPG mostrou baixa contagem de ovos nas fezes no final da cinética nos animais não imunossuprimidos em relação à detecção de antígenos e amplificação de bandas pela PCR;
- Em animais imunossuprimidos, houve elevada contagem de ovos pelo OPG, positividade na detecção de coproantígenos pelo ELISA e amplificação de bandas pela PCR em toda a cinética;
- A detecção de coproantígenos pelo ELISA pode ser uma ferramenta útil utilizada em amostras fecais de animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos;
- O diagnóstico molecular por PCR pode ser altamente sensível na amplificação de bandas em amostras de animais não imunossuprimidos e imunossuprimidos;
- Em comparação ao OPG, a detecção de coproantígenos pelo ELISA e amplificação de bandas pela PCR mostraram mais sensíveis nos dias analisados e podem ser métodos de escolha para diagnóstico da estrongiloidíase.

7. Referências

- AHMAD, A. F.; HADIP, F.; NGUI, R.; LIM, Y. A.; MAHMUD, R. Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. **Parasitology Research.** v. 112. p. 2811-2816, 2013.
- AMATO NETO, V.; CARIGNANI, F. L.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L. M. A. Tratamento de ratos, experimentalmente infectados pelo *Strongyloides venezuelensis*, através da ivermectina administrada por via oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 30. p. 481-484, 1997.
- BAILEY, J. W. Serological test for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* antibodies in ex far east prisoners of war. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** v.83. p.241-247, 1989.
- BASUNI, M.; MUHI, J.; OTHMAN, N.; VERWEIJ, J. J. AHMAD, M.; MISWAN, N.; RAHUMATULLAH, A.; AZIZ, F. A.; ZAINUDIN, N. S.; NOORDIN, R. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil transmitted helmints. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 84. p. 338-343, 2011.
- BAVA, B. A. J.; CECILIA, D.; ALCIDES, T.; DRISSCOLL, R. Adult female of *Strongyloides stercoralis* in respiratory secretions. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v. 3. p. 311-313, 2013.
- BENINCASA, C. C.; AZEVEDO, F. O.; CANABARRO, M. S.; VALENTIN, H. M.; SILVA, V. D.; SUPERTI, S. V.; DIAS, F. S. Hiper-infecção por *Strongyloides stercoralis*. Relato de caso. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva.** v. 19. p. 128-131, 2007.
- BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; SEQUI, M.; MEJIA, R.; CIMINO, R. O., KROLEWIECKI, A. J.; ALBONICO, M.; GOBBO, M.; BONAFINI, S.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; NUTMAN, T. B. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. **Plos Neglected Tropical Diseases.** v. 8. p. e2640, 2014.
- BONNE-ANNEÉ, S.; HESS, J. A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunology Research.** v. 51. p. 205-214, 2011.

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L.; SEET, R. C. S.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. **American Journal of Medicine.** v. 120. p. 545-548, 2007.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; SILVA, M. E.; FERNANDES, F. M.; MELO, A. L. Destrução de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 44. p. 389-391, 2011.

BROCKWELL, Y. M.; SPITHILL, T. W.; ANDERSON, G. R., GRILLO, V., SANGSTER, N. C. Comparative Kinetics of serological and coproantigen ELISA and faecal egg count in cattle experimentally infected with *Fasciola hepatica* and followrig treatment with triclabendazole. **Veterinary Parasitology.** v. 196. p. 417-426, 2013.

BUONFRATE, D.; ANGHEBEM, A.; GOBBI, F.; MUÑOZ, J.; REQUENA-MENDEZ, A.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; BISOFFI, Z. Imported strongyloidiasis: epidemiology, presentations, and treatment. **Current Infectious Disease Reports.** v. 14. p.256–262, 2012.

CELEDON, J. C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J.; GARCIA, R.; WIEST, P. M. Systemic strongyloidiasis in patientes infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and reviews of the literature. **Medicine.** v.73. p. 256-263, 1994.

CONCHA, R.; HARRINGTON, W. J.; ROGERS, A. L. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. **Journal of Clinical Gastroenterology.** v. 39. p. 203-211, 2005.

COOKSON, J. B.; MONTGOMERY, R. D.; MORGAN, H. V.; TUDOR, R. W. Fatal paralytic ileus due to strongyloidiasis. **British Medical Journal.** v. 4. p. 771-772, 1972.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana.** 12. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, p. 295-305, 2011.

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 39. p. 23-31, 1997.

DE BONA, S.; BASSO, R. M. C. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* associada ao uso crônico de corticosteróide. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** v. 40. p.247-250, 2008.

DE CARLI, G. A. **Seleção de método e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas.** São Paulo: Ed. Atheneu, p. 230, 2001

DORRIS, M. VINEY, M. E. BLAXTER, M. L. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **International Journal for Parasitology.** v. 32. p. 1507–1517, 2002.

EDELMAN, G. M.; POULIK, M. D. Studies on structural units of the gamma-globulins. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 113. p. 861-884, 1961.

EL-MALKY, M. A.; MARUYAMA, H.; AL-HARTHI, S. A.; EL-BESHBISHI, S. N.; OHTA, N. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. **Parasites & Vectors.** v. 6. p. 1-5, 2013.

FARDET, L.; GENÉREAU, T.; POIROT, J. L.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review. **Journal of Infectology.** v. 54. p. 18-27, 2006.

FINKELMAN, F. D.; MADDEN, K. B.; CHEEVER, A. W.; KATONA, I. M.; MORRIS, S. C.; GATELY, M. K.; HUBBARD, B. R.; GAUSE, W. C.; URBAN, J. F. J. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 179. p.1563–1572, 1994.

FREITAS, M. A. R. **Caracterização de cepas de *Entamoeba histolytica* isoladas de diferentes casos clínicos no Brasil: análise de expressão de genes possivelmente envolvidos com a patogenicidade.** Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology.** v. 125. p. 338-341, 2010.

GONÇALVES, A. L R.; RIBEIRO, T. S.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A novel approach based on antigen, antibody and immune complex detection in bronchoalveolar lavage fluid samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta Tropica.** v. 124. p. 166– 169, 2012.

GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, F. A.; CARDOSO, C. R.; BELLETI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology.** v. 158. p. 319-328, 2008.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H.V.A. New technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal of Communication Science in Industrial Organization.** v.12, p. 17–18, 1939.

GORDON, D.K.; ZADOKS, R. N.; STEVENSON, H.; SARGISON, N. D.; SKUCE, P.J. On farm evaluation of the coproantigen ELISA and coproantigen reduction test in Scottish sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology.** v. 187, p. 436-444, 2012.

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology.** v. 38, p. 251-309, 1996.

HASEGAWA, H.; HAYASHIDA, S.; IKEDA, Y.; SATO, H. Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species-specific diagnosis. **Parasitology Research.** v. 104. p. 869–874, 2009.

HUGGINS, D. Estrongiloidíase grave: relato de um caso. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 5. p. 159-171, 1971.

HUNT, P. W. Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. **Veterinarian Parasitology.** v. 180. p. 12-46, 2011.

IZQUIERDO, I.; BRIONES, J.; LLUCH, R.; ARQUEROS, C.; MARTINO, R. Fatal *Strongyloides* hyperinfection complicating a gram-negative sepsis after allogeneic stem cell transplantation: A case report and review of the literature. **Case Reports in Hematology.** v. 2013. p. 1-5, 2013.

JOHNSTON, S. P.; BALLARD, M. M.; BEACH, M. J.; CAUSER, L.; WILKINS, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organism in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41. p. 623-626, 2003.

KATZ, N. CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 14. p. 397-400, 1972.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17. p. 208-217, 2004.

KHIEU, V.; SCHÄR, F.; FORRER, A.; HATTERDORF, J.; MARTI, H.; SOCHEAT, D.; VOUNATSOU, P.; MUTH, S.; ODERMATT, P. High prevalence and spatial distribution of *Strongyloides stercoralis* in rural cambodia. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 8. p. e2854, 2014.

KIA, E.B.; MAHMOUDI, M.; ZAHABIUN, F.; MEAMAR, A. R. An evaluation on the efficacy of agar plate culture for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 2. p. 29–34, 2007.

KOCZKA, C. P.; HINDY, P.; GOODMAN, A.; GRESS, F. Strongyloidiasis: a diagnosis more common than we think. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 24. p.860–862, 2012.

KROLEWIECKI, A. J.; LAMMIE, P.; JACOBSON, J.; GABRIELLI, A. F.; LEVECKE, B.; SOCIAS, E.; ARIAS, L. M.; SOSA, N.; ABRAHAM, D.; CIMINO, R.; ECHAZU, A.; CRUDO, F.; VERCRUYSSSE, J.; ALBONICO, M. A Public Health Response against *Strongyloides stercoralis*:Time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. **Neglected Tropical Diseases**. v. 7. p. e2165, 2013.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Minneapolis: Burgess, 427p., 1979.

MANI, B. C.; MATHUR, M.; CLAUSS, H.; ALVAREZ, R.; HAMAD, E.; TOYODA, Y.; BIRKENBACH, M.; AHMED, M. *Strongyloides stercoralis* and organ transplantation. **Case Reports in Transplantation**. v. 2013. p. 1-6, 2013.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; FACCIOLO, L. H. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**. v. 29. p.549–557, 2007.

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONCALVES-PIRES, M. R. F.; LOUREIRO, Z. M.; ARAUJO, R. A; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, p. 154-158, 2008.

MANGANELLI, L.; BERRILLI, F.; DI CAVE, D.; ERCOLI, L.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D.; GIANGASPERO, A. Intestinal parasite infections in immigrant children in the city of Rome, related risk factors and possible impact on nutritional status. **Parasites & Vectors**. v. 5. p. 1-5, 2012.

MARCILLA, A.; GARG, G.; BERNAL, D.; RANGANATHAN, S.; FORMENT, J.; ORTIZ, J.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; DOMINGUEZ, M. V.; PEDROLA, L.; MARTINEZ-BLANCH, J.; SOTILLO, J.; TRELIS, M.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G. The transcriptome analysis of *Strongyloides stercoralis* L3i larvae reveals targets for Intervention in a neglected disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 6. p. e. 1513, 2012.

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 102. p. 314–318, 2008.

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F.; FRANÇA, T. G.; ISHIKAWA, L. L.; AMARANTE, A. F.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105. p. 57-61, 2010.

MATSUMOTO, M.; SASAKI, Y.; YASUDA, K.; TAKAI, T.; MURAMATSU, M.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K. IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. **Infection and Immunity**. v.81. p. 2518–2527, 2013.

MCORIST, A. L.; JACKSON, M.; BIRD, A. R. A comparasion of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **Journal of Microbiological Methods**. v.50. p. 131-139, 2002.

MEJIA, R.; NUTMAN, T. B. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 25. p. 458-463, 2012.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação.** 1^a edição, ed. EDUFU. p. 81-111, 2005.

MOGHADDASSANI, H.; MIRHENDI, H.; HOSSEINI, M.; ROKNI, M. B.; MOWLAVI, G.H.; KIA, E. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection by PCR detection of specific DNA in human stool samples. **Iranian Journal Parasitology.** v. 6. p.23-30, 2011.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública,** v. 1. p. 507-624, 1948

MUKERJEE, C. M.; CARRICK, J.; WALKER, J. C.; WOODS, R. L. Pulmonary strongyloidiasis presenting as chronic bronchitis leadin to interlobular septal fibrosis and cured by treatment. **Respirology.** v. 8, p. 536-540, 2003.

NAGESWARAN, C.; CRAIG, P.S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology** 108, 335-342, 1994.

NAKAI, E. S.; AMARANTE, A. F. T. Experimental infection of mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus*) with *Strongyloides venezuelensis*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology.** v. 10. p. 1-6, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; BARSANTE, M. M.; SOUZA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis* infected mice. **Infection and Immunity**, v. 72. p. 1135-1142, 2004.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana.** 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

NUNES, M. V. O.; CÂMARA, C. P.; CRESPO, A. M. C.; CARVALHAES, M.; OLIVEIRA, C. R.; SILVEIRA, L. A. Comparação do perfil de anticorpos antiimunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes adjuvantes. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. VI. p. 44-50, 2009.

NUÑEZ, Y. O.; FERNÁNDEZ, M. A.; TORRES-NUÑEZ, D.; SILVA, J. A.; MONTANO, I.; MAESTRE, J. L. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 64. p. 293-297, 2001.

OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97. p. 119-121, 2002.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**. v. 138. p.1331-1340, 2011.

PAULA, F. M.; CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M. D.; MARÇAL, M. D.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 42. p. 51–55, 2000.

PAULA, F. M.; SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; GOTTARDI, M.; CORRAL, M. A.; GRYSCHEK, R. C.; CHIEFFI, P. P. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 55. p.141-143, 2013.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. P. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v. 6. p. 4-13, 2009. Disponível: <http://bvsalud.org/portal/resource/en/ses-18620>

PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. v. 48. p.175–182, 1993.

PONTES, L A.; OLIVEIRA, M. C.; KATZ, N.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene.** v. 68. p. 652-656, 2003.

PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; JUNIOR, O J.; CARVALHO, J.; MARCELINO, E. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrongiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 35, p. 641-649, 2002.

PUTLAND, R. A.; THOMAS, S. M.; GROVE, D. I.; JOHNSON, A. M. Analysis of the 18S ribosomal RNA gene of *Strongyloides stercoralis*. **Internacional Journal of Parasitology.** v. 23. p. 149–151, 1993.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZZETTI, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v.19. p. 32-38, 2010.

RAMANATHAN, R.; NUTMAN, T. *Strongyloides stercoralis* infection in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Reports.** v. 10. p.105–110, 2008.

RAYAN, H. Z.; SOLIMAN, R. H.; GALAL, N. M. Detection of *Strongyloides stecoralis* in faecal samples using conventional parasitological techniques and real – time PCR: a comparative estudy. **Research Article.** v. 5. p. 27-34, 2012.

REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrongiloidíase. In: _____. **Parasitologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 410p, 2011.

RIBEIRO, L. C.; JUNIOR, E. N. A. R; SILVA, M. D.; TAKIUCHI, A.; FONTES, C. J. F. Púrpura em paciente com estrongiloidíase disseminada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 38. p. 255-257, 2005.

RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; NETO, V. A. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 41. p. 648 – 653, 2008.

ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. **Parasitology Research.** v. 84. p. 50-53, 1998.

ROSSIT, A. R. B.; GONÇALVES, A. C. M.; FRANCO, C.; MACHADO, R. L. D. Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency virus-1: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 51. p. 59-65, 2009.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** v. 14. p. 5-8, 1954.

SADJADI, S. A.; DAMODARAN, C.; SHARIF, M. *Strongyloides stercoralis* infection in transplanted patients. **American Journal of Case Reports.** v. 14. p. 205-209, 2013.

SANTOS, H. L.; PERALTA, R. H.; MACEDO, H. W.; BARRETO, M. G.; PERALTA, J. M. Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v. 11. p. 365-370, 2007.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **International Journal for Parasitology.** v. 20. p.57-62, 1990.

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U. L. F.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H. VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: Global distribution and risk factors. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v.7. p. e2288, 2013.

SCHÄR, F.; HATTENDORF, J.; KHIEU, V.; MUTH, S.; CHAR, M. C.; MARTI, H. P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis* larvae excretion patterns before and after treatment. **Parasitology.** v. 141. p. 892-897, 2014.

SCHEINMAM, R. I.; COQSWELL, P. C.; LOFQUIST, A. K.; BALDWIN, A. S. J. Role of transcriptional activation of IB in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science.** v.270. p.283-286, 1995.

SCHILTER, H. C.; PEREIRA, A. T.; ESCHENAZI, P. D.; FERNANDES, A.; SHIM, D.; SOUSA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORREA, D. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite Immunology.** v. 32. p. 184-192, 2010.

SHETH, S.; ASSLO, F.; HALLIT, R.; SISON, R.; AFRIDI, M.; SPIRA, R.; DEPASQUALE, J.; SLIM, J.; BOGHOSSIAN, J. Strongyloidiasis: The cause of multiple gastrointestinal ulcers in an immunocompetent individual. **Case Reports in Medicine.** v. 2014. p. 1-3, 2014.

SIDDQUI, A. A.; BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases.** v. 33. p. 1040-1047, 2001.

SING, A.; LEITRITZ, L.; BOGNER, J. R., HEESEMANN, J. First-glance diagnosis of *Strongyloides stercoralis* autoinfection by stool microscopy. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 37. p. 1610-1611, 1999.

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases.** v. 37. p. 211–215, 2005.

SITTA, R. B. **PCR convencional no diagnóstico molecular da estrongiloidíase humana.** Dissertação (mestrado em Ciências do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo. 87 p., 2013.

SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W. de; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: Importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical.** v. 35. p. 173-184, 2006.

SYKES, A. M.; MCCARTHY, J. S. Coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v. 5. p. e955, 2011.

TAIRA, N.; NAKAMURA, Y.; ALMEIDA, M. O.; SAEKI, H. Massive experimental infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats and absence of sudden death. **The Journal of Veterinary Medical Science.** v. 57. p. 855-858, 1995.

TEFÉ-SILVA, C.; SOUZA, D.I.; UETA, M.T.; FLORIANO, E.M.; FACCIOLE, L.H.; RAMOS, S.G. Interference of dexamethasone in the pulmonary cycle of *Strongyloides venezuelensis* in rats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 79. p.571-578, 2008.

VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy.** v. 4. p.1-13, 2006.

VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A.; POLDERMAN, A. M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 103. p. 342-346, 2009.

VIANNA, E. N. **Avaliação da técnica de PCR no diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes brasileiros.** Dissertação (mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. 90 p., 2006.

VIJAYAN, V. K. Parasitic lung infections. **Current Opinion in Pulmonary Medicine.** v.15. p.274–282, 2009.

VINEY, M. E.; LOCK, J. B. *Strongyloides* spp. 2007. In: HODGKIN, J.; ANDERSON, P. **Wormbook:** The *C. elegans* Research Community. Disponível em: <http://www.wormbook.org>. Acesso em 15/04/14.

YOSHIDA, H. ENDO, H. TANAKA, S. ISHIKAUA, A.; KONDO, H.; NAKAMURA, T. Recurrent paralytic ileus associated with strongyloidiasis in a patient with systemic lupus erythematosus. **Modern Rheumatology.** v. 16. p. 44–47, 2006.

WALLEN, N.; KITA, H.; WEILER, D.; GLEICH, G. J. Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. **Journal of Immunology,** v.147, p. 3490- 3495, 1991.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbioloy Reviews.** v 8. p. 113-130, 1995.

WONGRATANACHEEWIN, S.; PUMIDONMING, W.; SERMSWAN, R. W.; MALEEWONG, W. Development of a PCR-based method for detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. **Parasitology.** v. 122. p. 175-180, 2001.

WU, T.C.; LEI, W. Yf.; CHEN, M. C.; HU, C. T. *Strongyloides stercoralis* infection: a health issue regarding indigenous people in Taiwan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 106. p. 468–472, 2012.