

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

**TALITA RODRIGUES DOS SANTOS**

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE ESPÉCIE-ESPECÍFICA PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS  
ESPÉCIES *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum***

**Belo Horizonte**

**2021**

**TALITA RODRIGUES DOS SANTOS**

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE ESPÉCIE-ESPECÍFICA PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS  
ESPÉCIES *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Parasitologia como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Parasitologia.  
Área de concentração: Helminologia

Orientação: Dra. Elida Mara Leite Rabelo  
Coorientação: Dr. Luis Fernando Viana Furtado

**Belo Horizonte**

**2021**

043

Santos, Talita Rodrigues dos.

Padronização e aplicação de uma reação em cadeia da polimerase espécie-específica para diferenciação entre as espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* [manuscrito] / Talita Rodrigues dos Santos. - 2021.

72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Dra. Elida Mara Leite Rabelo. Coorientação: Dr. Luis Fernando Viana Furtado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Ascaris*. 3. Técnicas de Genotipagem. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. 5. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 6. Zoonoses. I. Rabelo, Elida Mara Leite. II. Furtado, Luis Fernando Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Talita Rodrigues dos Santos**420/2021/03  
entrada  
1º/2019  
2019654215

Às **quatorze horas** do dia **19 de abril do ano de 2021**, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/ywu-unym-uvk>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Padronização e aplicação de uma reação em cadeia da polimerase espécie-específica para diferenciação entre as espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*”** área de concentração: **Helmintologia**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dra. Élide Mara Leite Rabelo** após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Élide Mara Leite Rabelo	UFMG	Aprovada
Dr. Felipe Bisaggio Pereira	UFMG	Aprovada
Dr. Ricardo Nascimento Araujo	UFMG	Aprovada
Dr. Luis Fernando Viana Furtado	UEMG/Passos	Aprovada

**Expedição do resultado final.**

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Foram repassadas à aluna durante a arguição

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 19 de abril de 2021.****Dra. Élide Mara Leite Rabelo**  
(Orientadora)**Dr. Felipe Bisaggio Pereira****Dr. Ricardo Nascimento Araujo****Dr. Luis Fernando Viana Furtado**  
(Coorientador)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir existir e poder contemplar as exuberantes obras feitas por suas mãos e junto com a criação poder te louvar com a minha existência;

À Elida, por sua excelente orientação e por ter me acolhido tão bem em seu laboratório. Obrigada pela confiança, por acreditar em mim e por fazer parte de um processo que me transformou positivamente. Você é um grande exemplo de ética, profissionalismo e generosidade;

Ao Fernando Furtado, cuja atuação ultrapassou as fronteiras da orientação. Ao pensar em você, meu bom amigo, penso em como o mundo seria um lugar melhor se existissem mais pessoas como você, mas sinto que ele já é mais bonito por você estar aqui. Obrigada por me ensinar tão pacientemente alguns dos mistérios da biologia molecular, por sanar minhas constantes dúvidas e aliviar os meus receios. Ficarás marcado para sempre em minha história como um belo exemplo de dedicação, empatia, caridade e nobreza;

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa de pesquisa e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto;

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, em nome dos coordenadores, Daniella Bartholomeu e Hudson Alves, pela minha formação;

Ao professor Ricardo T. Fujiwara pelo fornecimento de algumas amostras;

Ao Pedro Germano (EV-UFGM) e Leandro Macedo (UEMA) pela ajuda nas coletas das amostras de suínos;

Ao professor Ricardo Vitor e a Rosálida (Rosinha), por toda a gentileza, carinho, conselhos e conversas. Sem dúvida, vocês são uma das melhores pessoas que já conheci;

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, em especial a Sumara Ferreira e a Sibebe Abreu por me socorrerem nas frequentes dúvidas e serem tão boas no que fazem e ao Manuel Carlos por cuidar tão bem dos animais;

À Andreina Carvalho, sinônimo de força, lealdade e amor. Minha amiga, muito obrigada por caminhar comigo, por ceder horas do seu tempo para me ajudar e por sempre me dizer que “vai dar tudo certo, Tatazinha”. Te ter ao lado tornou a caminhada mais doce e alegre. Serei eternamente grata a Deus por ter te conhecido.

À Nayara Mendes, sua bondade no ser, paciência em ensinar e acolhimento são dádivas das quais pude desfrutar enquanto estivemos juntas. Obrigada pela bela amizade;

À Vivian Jordania, que me acolheu durante a iniciação científica e me incentivou a entrar no mestrado, sempre tão bem disposta a ajudar e a acolher. Serei sempre grata por sua ajuda e nunca me esquecerei de tudo o que fez por mim;

À Celi Medeiros, pela ajuda na obtenção e processamento das amostras de suínos e por ser sempre tão bem disposta e animada;

À turma de mestrado, em especial, Mariana Sebastiani. Quantas emoções vivemos juntas! Não poderia ter feito parte de uma turma melhor. Quero ir para Januária com vocês outra vez.

Fazer uma bela fogueira, olhar o céu estrelado e acordar cedo para desmontar armadilhas e fazer exames de fezes;

À minha família, em especial, minha mãe Nina, meu irmão Diego, minha priminha Júlia, minha avó Alcina e tio Celso. Minha amada mãe, você é o meu exemplo de “sirva uns aos outros em amor” e “retribua o mal com o bem”. Diego, você é o meu orgulho, meu exemplo e meu irmão e amigo tão amado. Júlia, bem disseram que “alguns sem saber hospedaram anjos”. Vó, obrigada pelas danças pela sala, pelas “cantorias” e pelas conversas, em breve as coisas irão melhorar e faremos isso outra vez. Tio Celso, você é a pessoa mais pura e amável do mundo todo, logo estaremos juntos também.

A todos os que são duramente afetados pelas mazelas das geo-helmintoses e de outras doenças negligenciadas, espero que ao longo da minha caminhada eu possa minimizar, mesmo que indiretamente, as suas dores;

A todos os parasitologistas e demais cientistas brasileiros, os que partiram, mas que jamais serão esquecidos e os que seguem na caminhada. Vocês são o meu orgulho e incentivo.

*“É bom amar tanto quanto possamos,  
pois nisso consiste a verdadeira força,  
e aquele que ama muito realiza  
grandes coisas e é capaz, e o que se  
faz por amor está bem feito.”*

*Vicent Van Gogh*

## RESUMO

*Ascaris lumbricoides* e *A. suum* são descritos como as espécies de *Ascaris* que infectam seres humanos e suínos, respectivamente. Estima-se que cerca de 447 milhões de pessoas estejam infectadas por *A. lumbricoides*, sendo predominantes em crianças residentes nos países em desenvolvimento, caracterizando um sério problema econômico e de saúde pública nos países afetados. No entanto, existe um número crescente de casos de ascaridíase humana, mesmo em países cujos índices para esta parasitose eram baixos ou mesmo nulos. Nessas localidades, os suínos têm sido incriminados como a principal fonte de infecção para humanos. Apesar das formas adultas de ambas as espécies apresentarem diferenças morfológicas sutis, a obtenção não é trivial. Além disso, os exames parasitológicos, comumente usados na prática clínica, são incapazes de diferenciar espécies de *Ascaris* a partir dos ovos encontrados nas fezes. Todavia, técnicas moleculares têm sido propostas para realizar tal diferenciação. Por conseguinte, o presente trabalho teve como objetivo a padronização e aplicação de um ensaio da Reação em cadeia da polimerase (PCR) espécie-específica, baseada na metodologia PCR alelo-específico (AS-PCR), tendo como alvo molecular o Espaço Transcrito Interno 1 (ITS-1) do DNA ribossomal para varredura e identificação das espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* a partir do ovo. Os controles positivos foram sintetizados por meio de PCR convencional e clonagem para padronização da técnica e uso nas reações. Foram obtidas amostras de fezes positivas de 68 pacientes de sete estados brasileiros para identificação das espécies. Amostras de fezes de seis suínos de duas propriedades de Minas Gerais também foram utilizadas como forma de validação da técnica. Após os processos de recuperação e incubação dos ovos de *Ascaris*, o DNA de ovo único foi utilizado nas PCR espécie-específica. Após as reações, todas as amostras obtidas de humanos foram genotipadas como *A. lumbricoides* e todas as amostras obtidas de suínos foram genotipadas como *A. suum*. Uma porcentagem (2,9%) dessas amostras foram sequenciadas para validação da técnica. Os resultados encontrados foram condizentes com a literatura vigente, a qual demonstra que em regiões endêmicas os ciclos de transmissão são separados, apesar de ser assumida a presença de um fluxo gênico limitado entre as espécies. Dessa forma, a execução desse trabalho possibilitou a padronização de uma metodologia útil para o diagnóstico diferencial das espécies, contribuindo para a caracterização do real perfil epidemiológico da ascaridíase humana e suína no Brasil. Os dados aqui apresentados podem auxiliar na implementação de futuras estratégias de controle.

**Palavras-chave:** *Ascaris*. Genotipagem. Técnicas moleculares. PCR espécie-específica. Zoonose.



## ABSTRACT

*Ascaris lumbricoides* and *A. suum* are described as the species of *Ascaris* infecting humans and pigs, respectively. It is estimated that about 447 million people are infected with *A. lumbricoides*, being predominant in children living in developing countries, characterizing a serious economic and public health problem in the affected countries. However, there is an increasing number of cases of human ascariasis, even in countries whose rates for this parasitosis were low or even zero. In these locations, pigs have been blamed as the main source of infection for humans. Despite the adult forms of both species presenting subtle morphological differences, obtaining is not trivial. In addition, parasitological tests, commonly used in clinical practice, are unable to differentiate *Ascaris* species from the eggs found in the feces. However, molecular techniques have been proposed to carry out such differentiation. Therefore, the present study aimed to standardize and apply a species-specific polymerase chain reaction (PCR) assay, based on the allele-specific PCR (AS-PCR) methodology, with the Transcribed Internal Space as a molecular target 1 (ITS-1) of ribosomal DNA for scanning and identification of *A. lumbricoides* and *A. suum* species from the egg. The positive controls were synthesized by means of conventional PCR and cloning for standardization of the technique and use in reactions. Positive stool samples were obtained from 68 patients from seven Brazilian states to identify the species. Stool samples from six pigs from two farms in Minas Gerais were also used as a way of validating the technique. After the recovery and incubation processes of *Ascaris* eggs, single egg DNA was used in species-specific PCR. After the reactions, all samples obtained from humans were genotyped as *A. lumbricoides* and all samples obtained from pigs were genotyped as *A. suum*. A percentage (2.9%) of these samples were sequenced for validation of the technique. The results found were consistent with the current literature, which demonstrates that in endemic regions the transmission cycles are separated, although the presence of a limited gene flow between species is assumed. Thus, the execution of this work enabled the standardization of a useful methodology for the differential diagnosis of species, contributing to the characterization of the real epidemiological profile of human and swine ascariasis in Brazil. The data presented here can assist in the implementation of future control strategies.

**Keywords:** *Ascaris*. Genotyping. Molecular techniques. Species-specific PCR. Zoonosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática do ciclo biológico de <i>A. lumbricoides</i> .....	18
<b>Figura 2</b> - Esquema adotado para diferenciação molecular de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> .....	39
<b>Figura 3</b> - Análises para padronização da técnica utilizando plasmídeos e DNA genômico de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> adulto .....	43
<b>Figura 4</b> - Avaliação da especificidade dos primers utilizados .....	44
<b>Figura 5</b> - Varredura para diferenciação molecular de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> de amostras humanas .....	45
<b>Figura 6</b> - Diferenciação molecular de ovos de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> de amostras de suínos .....	46
<b>Figura 7</b> - Cromatograma referente ao sequenciamento da região ITS-1 de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> .....	47
<b>Figura 8</b> - Cromatograma referente ao sequenciamento da região ITS-1 de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> .....	48

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Técnicas e alvos moleculares usados na identificação e em estudos epidemiológico-moleculares com <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> .....	29
<b>Quadro 2</b> - Dados das amostras de humanos genotipadas no estudo.....	32
<b>Quadro 3</b> - Descrição das localidades, número de suínos e quantidade de ovos que foram genotipados no estudo.....	33
<b>Quadro 4</b> - Primers para diagnóstico diferencial de <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Ascaris suum</i> .....	35
<b>Quadro 5</b> - Número de ovos recuperados e amplificados por pacientes em cada estado..	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADM</b>	Administração do Fármaco em Massa
<b><i>A.lumbricoides</i></b>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<b><i>A.suum</i></b>	<i>Ascaris suum</i>
<b>AS-PCR</b>	<i>Allele Specific- PCR</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso Animal
<b>COEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>Cox</b>	Citocromo C oxidase
<b>Cyt-b</b>	Citocromo B
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Del</b>	Deleção
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNA<sub>m</sub></b>	DNA mitocondrial
<b>DNA<sub>r</sub></b>	DNA ribossomal
<b>DNA<sub>ss</sub></b>	<i>DNA single strand</i>
<b>DTNs</b>	Doenças Tropicais Negligenciadas
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>G</b>	Guanina
<b>G</b>	Genótipo
<b>H</b>	Haplótipo
<b><i>HaeIII</i></b>	<i>Haemophilus aegyptius III</i>

<b>HPJ</b>	Hoffman, Pons e Janer
<b>HTS</b>	Helmintos Transmitidos pelo Solo
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
<b>ITS</b>	Espaçador Transcrito Interno
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>L3</b>	Larva de terceiro estágio
<b>L4</b>	Larva de quarto estágio
<b>miRNA</b>	<i>micro Ribonucleic acid</i>
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Min</b>	Minuto
<b>MgCl</b>	Cloreto de Magnésio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NADH</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
<b>Pb</b>	pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>RFLP- PCR</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR</i>
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse Transcriptase- Real Time- PCR</i>
<b>SDS</b>	Duodecil Sulfato de Sódio
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SSCP-PCR</b>	<i>Single Strand Conformation Polymorphism-PCR</i>
<b>T</b>	Timina

<b>TAE</b>	Tris/ Ácido Acético/ EDTA
<b>Tris-HCl</b>	Tris Hidrocloreto
<b>μL</b>	Microlitro
<b>YLDs</b>	Years Lived with Disability
<b>Xg</b>	força centrífuga relative

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Ascaridíase	16
1.1.1	<i>Ascaridíase Humana</i>	16
1.1.2	<i>Ascaridíase Suína</i>	19
1.1.3	<i>Potencial zoonótico e infecção cruzada</i>	20
1.2	Marcadores Moleculares	22
1.3	O Desafio Diagnóstico no Contexto da Ascaridíase	25
1.3.1	<i>Técnicas Convencionais</i>	25
1.3.2	<i>Técnicas moleculares para genotipagem</i>	26
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
4.1	Comitê de Ética	32
4.2	Obtenção, processamento e extração de DNA de ovos	32
4.3	Extração e dosagem de DNA de helminto adulto	34
4.4	Desenho dos primers	34
4.5	Controles	35
4.6	Clonagem	36
4.7	Recuperação do DNA plasmidial	37
4.8	Determinação espécie-específica	37
4.9	Purificação do DNA	40
4.10	Sequenciamento	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1	Padronização da técnica PCR espécie-específica para a genotipagem de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i>	42
5.2	Varredura de ovos de <i>Ascaris</i> em amostras de fezes humanas	44

5.3	Genotipagem de ovos de <i>Ascaris</i> em amostras de fezes de suínos	45
5.4	Sequenciamento para validação da técnica	47
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXO A - Produção Resultante da Dissertação</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO B - Produção Resultante de Colaborações</b>	<b>72</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ascaridíase

### 1.1.1 *Ascaridíase Humana*

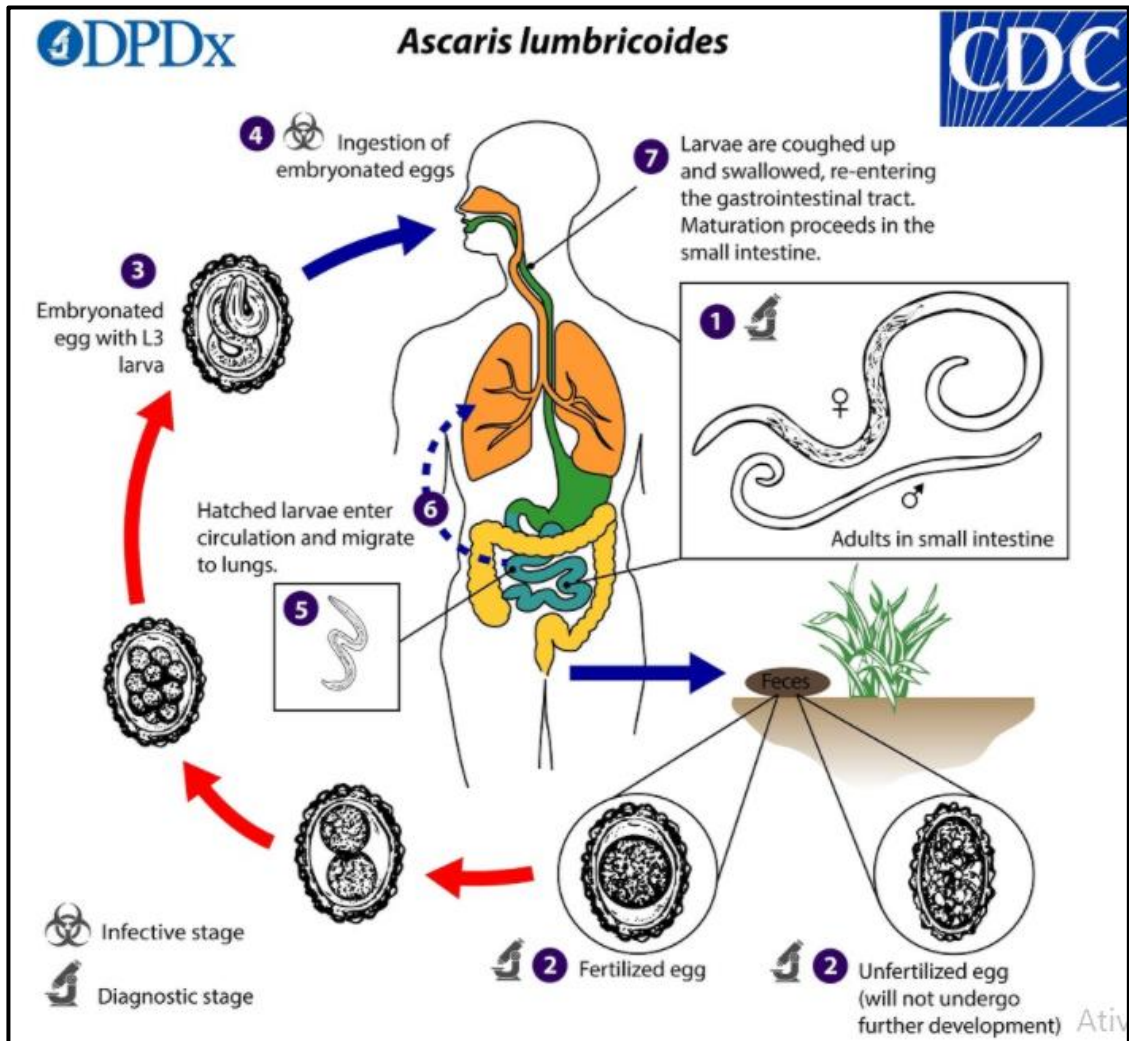
A ascaridíase humana é uma doença infecciosa cujo agente etiológico reportado é o helminto parasito, nematódeo, pertencente a ordem Ascarididae, *Ascaris lumbricoides*, descrito por Linnaeus em 1758. Esta espécie juntamente com *Trichuris trichiura* e os ancilostomídeos fazem parte do grupo dos helmintos transmitidos pelo solo (HTS). Estes helmintos estão inclusos no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) acometendo, aproximadamente, 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, com cerca de 4 bilhões de pessoas em risco de ser infectadas (Silva et al., 2003; Pullan et al., 2014; Jourdan et al., 2018).

*Ascaris lumbricoides* é o geo-helminto mais prevalente nas regiões endêmicas apresentando uma ampla distribuição geográfica, infectando cerca de 447 milhões de indivíduos, com percentuais de infecção acima de 20%, em regiões da Ásia, África Sub-Sahariana e América Latina (Pullan et al., 2014; GBD 2017, 2018; Okoyo et al., 2020). Nestas regiões, a alta prevalência de helmintíases está intimamente relacionada às condições de saneamento básico e práticas de higiene precárias, condições estas diretamente associadas à pobreza, além dos fatores climáticos que favorecem o ciclo biológico do parasito (Lai et al., 2019). Apesar dos casos de ascaridíase majoritariamente não evoluírem para o óbito, essa doença acarreta cerca de 604 mil anos de vida vividos com deficiência (YLDs), consistindo em um sério problema econômico e de saúde nos países afetados (WHO, 2010; GBD 2017, 2018).

A parcela da população mais acometida pela infecção são as crianças em idade escolar (menores de 15 anos), consistindo em uma infecção idade-dependente (Anuar et al., 2014; Karshima, 2018; Okoyo et al., 2020). Nesta faixa-etária, os danos decorrentes da infecção, mesmo que inaparentes, podem causar prejuízos relevantes ao desenvolvimento físico e cognitivo dos acometidos (Jardim-Botelho et al., 2008; Blouin et al., 2018). Concernente às manifestações clínicas, na maioria dos casos os infectados são assintomáticos, e quando presentes, as manifestações são dependentes da fase do ciclo biológico do parasito e carga parasitária, além das questões inerentes ao hospedeiro, como o status nutricional e imunológico (Bethony et al., 2006; Umetsu et al., 2014; Mbangi et al., 2019).

A infecção por *Ascaris* ocorre pela rota oral-fecal a partir da ingestão de ovos embrionados, contendo a larva de terceiro estágio (L3), presentes em água ou alimentos contaminados. Os ovos, recém-eliminados nas fezes, precisam passar por um período de embrionamento no solo, com temperaturas médias entre 25 a 35 °C durante cerca de 30 dias, podendo permanecer viáveis por vários meses ou mesmo anos, dependendo das condições climáticas (Seamster, 1950; Brooker et al., 2002; Brooker et al., 2006; Mejer e Roepstorff, 2011; Kim et al., 2012).

Essa longa viabilidade dos ovos de *Ascaris* no solo é conferida pelas membranas externa mamilonada, intermediária e interna, tornando os ovos resistentes à dessecação. Faz-se necessário o emprego de diferentes substâncias químicas em determinadas concentrações para alcançar a permeabilidade das membranas e consequente inviabilidade das larvas, o que dificulta algumas estratégias de controle (Barrett, 1976; Katakam et al., 2014). Após a ingestão, os ovos contendo as L3 alcançam o intestino delgado, as larvas eclodem e migram para a porção cecal e colônica terminal do intestino, onde iniciam o processo de penetração na mucosa. Através da circulação portal, as larvas alcançam o fígado, seguindo o processo de migração e por meio da circulação sanguínea, chegam aos pulmões, onde sofrem muda para larvas de quarto estágio (L4). A passagem das larvas pelo sistema respiratório pode resultar em diferentes complicações como a síndrome de Loeffler, um quadro clínico caracterizado por febre, tosse, reações alérgicas, eosinofilia e níveis elevados de IgE (Avery et al., 2018; Cheema et al., 2019). As L4 penetram no espaço alveolar, alcançando a faringe, onde, se deglutidas, retornam ao intestino delgado. No intestino delgado, as L4 sofrem muda para adulto jovem, os quais atingem a maturidade sexual, transformando-se em adultos, alojando-se, preferencialmente, no jejuno e íleo e realizando a cópula. O período entre a ingestão da forma infectante até a liberação de ovos nas fezes pode variar entre 8 a 11 semanas pós-infecção, com cada fêmea liberando, em média, 200 mil ovos por dia (Dold e Holland, 2011). Em casos de alta carga parasitária, pode haver distensão abdominal, depauperamento nutricional, com prejuízos no desenvolvimento físico e cognitivo, extravasamento de helmintos adultos via ânus ou nasofaringe e obstrução e perfuração intestinal, podendo, em alguns casos, evoluir para o óbito (Bethony et al., 2006; Gan et al., 2014; Umetsu et al., 2014; Mbanga et al., 2019). O ciclo biológico de *A. lumbricoides* está ilustrado na Figura 1.



**Figura 1** - Representação esquemática do ciclo biológico de *A. lumbricoides*. Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/ascariasis/index.html>.

Nos países em desenvolvimento, a deficiência ou ausência de saneamento básico, práticas de higiene precárias e uma elevada parcela da população com baixos índices econômicos são alguns dos fatores que têm sido apontados como elementos causais para a permanência da endemidade de algumas regiões, apesar da redução dos níveis de infecção em decorrência das campanhas de administração de fármacos (anti-helmínticos) em massa (AFM) (WHO, 2004; Anuar et al., 2014; Okoyo et al., 2020). Concernente à AFM, apesar dos amplos benefícios decorrentes das campanhas de tratamento profilático, de acordo com o nível de endemidade de cada região, alguns trabalhos têm reportado SNPs (polimorfismos de nucleotídeos únicos) relacionados à resistência de *A. lumbricoides* aos benzimidazóis, configurando mais um desafio no contexto desta helmintíase (Diawara et al., 2013; Furtado et al., 2019).

### 1.1.2 *Ascaridíase Suína*

Estimativas apontam que há um elevado percentual de infecção por parasitos intestinais nos rebanhos suínos em todo o mundo, principalmente entre suínos criados em sistemas de produção animal extensivos e orgânicos quando comparados aos sistemas de produção animal industrializados. Nestes rebanhos, uma das espécies de parasito mais reportado é o helminto *A. suum*, descrito por Goeze (1782) (Roepstorff et al., 2011; Nissen et al., 2011; Thamsborg et al., 2013; Katakam et al., 2016).

O ciclo biológico de *A. lumbricoides* e *A. suum* é bastante similar. Sucintamente, o hospedeiro suíno é infectado ao ingerir os ovos larvados contendo as L3, que estão presentes em água ou alimentos contaminados. Esses ovos possuem longa viabilidade no solo, sendo relatado o encontro de ovos viáveis após nove anos nos países nórdicos que, associado ao ato coprofágico dos suínos, aumentam substancialmente as chances de infecção (Nejsun et al., 2009; Roepstorff et al., 2011).

Após a ingestão ocorre a eclosão das larvas no intestino, as quais iniciam o processo de penetração na mucosa intestinal, alcançando o fígado. A intensa migração das larvas pelo parênquima hepático resulta em pontos de fibrose, conhecidos como “manchas de leite” com consequente condenação da víscera ou carcaça no abate. Em seguida, as larvas seguem o processo de migração pelos pulmões e retornam ao intestino delgado. Esse processo de migração extra intestinal dura aproximadamente três semanas e, findada a migração, grande parcela das larvas são expelidas (Roepstorff e Murrell, 1997; Nejsun et al., 2009). As larvas remanescentes desenvolvem-se em helmintos adultos e após seis a oito semanas de infecção, macho e fêmea realizam a cópula, com liberação dos ovos nas fezes (Nejsun et al., 2009; Dold e Holland, 2011; Roepstorff et al., 2011).

Normalmente a infecção em suínos é subclínica, tornando o diagnóstico frequentemente negligenciado, no entanto, alguns animais podem apresentar perda de peso e redução da conversão alimentar em virtude do elevado parasitismo intestinal, resultando em condenação do fígado devido à intensa migração das larvas, causando perdas econômicas significativas (Stewart e Hale, 1988; Roepstorff et al., 2011; Thamsborg et al., 2013; Fausto et al., 2015).

É possível encontrar níveis variados de infecção por *Ascaris* em todas as fases de vida dos suínos, sendo que os mais densamente parasitados são os suínos em fase de engorda (Roepstorff et al., 1998). No entanto, a carga parasitária entre suínos mostra uma distribuição

agregada em que 22 a 27% dos animais albergam cerca de 80% da carga parasitária total dentro de uma população (Nejsun et al., 2009). No Brasil, estudos avaliando a ascaridíase suína demonstraram que, os maiores percentuais de positividade para a infecção foram encontrados, principalmente, nos sistemas de criação extensivo, de caráter familiar, com uma variação de 2,3 a 22% de positividade para *Ascaris* (Pinto et al., 2007; Barbosa et al., 2015b; Araújo et al., 2020). Em contrapartida, entre suínos criados em sistemas de produção industrializados, foi detectada uma prevalência que variou de 0,09 a 1,85% de infecção por *Ascaris* (d'Alencar et al., 2006; Antunes et al., 2011; Barbosa et al., 2015b).

A única estratégia disponível para tratamento da ascaridíase, bem como de outras helmintíases, são as poucas classes de fármacos anti-helmínticos disponíveis, sendo estes amplamente utilizados nos rebanhos como medidas de tratamento e profilaxia. No entanto, devido ao uso indiscriminado, tem sido reportada uma redução significativa na eficácia de alguns destes fármacos para determinados nematódeos gastrointestinais de ovinos e bovinos (Gasbarre, 2014; Playford et al., 2014). Com relação a *A. suum*, SNPs relacionados à resistência nunca foram descritos (Palma et al., 2020). No entanto, um estudo *in vitro* demonstrou que é necessária uma dose elevada de Levamisol para inibir efetivamente a migração e sobrevivência das larvas de *A. suum* em suínos da China e Dinamarca, demonstrando uma preocupante redução da eficácia deste fármaco (Zhao et al., 2017).

### *1.1.3 Pontencial zoonótico e infecção cruzada*

Nos últimos anos têm ocorrido algumas mudanças consideráveis no quadro epidemiológico da ascaridíase humana no mundo, devido a relatos crescentes de infecção em países desenvolvidos, onde outrora os casos de infecção humana eram baixos ou inexistentes. Nestas regiões, quando descartada a infecção em decorrência de residência e ou viagem recentes a áreas endêmicas, a contaminação veiculada por fezes de suínos tem sido apontada como principal fonte de infecção para os humanos (Arizono et al., 2010; Roepstorff et al., 2011; Miller et al., 2015; Avery et al., 2018; Taus et al., 2019). Infecções experimentais e naturais têm demonstrado que *A. lumbricoides* e *A. suum* possuem a capacidade de infectar e completar o seu ciclo biológico no hospedeiro não-próprio (Takata, 1951; Sparks et al., 2015; Barbosa, 2015a; Avery et al., 2018).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a exposição ocupacional pode ser um fator de risco para a aquisição da infecção por *Ascaris* em humanos, especialmente quando as medidas de proteção individual não são seguidas durante o manejo, sendo que os profissionais

veterinários que trabalham com o rebanho suíno apresentam uma maior probabilidade de positividade para *Ascaris* quando comparados com os veterinários que não passaram pela mesma exposição ocupacional (Avery et al., 2018; Taus et al., 2019).

Um estudo realizado na Holanda analisando amostras de soro coletadas ao longo de 11 anos referentes a casos suspeitos de larva migrans visceral e ocular revelou uma soropositividade de 33% para *Ascaris*, enquanto que foi detectada uma soropositividade de 8% para *Toxocara* (Pinelli et al., 2011). O país não é endêmico para *A. lumbricoides*, no entanto, entre suínos criados nos sistemas de produção extensivos e orgânicos, foram detectadas prevalências de 50% e 72,7%, respectivamente, de infecção por *Ascaris* (Eijck e Borgsteede, 2005). Na Dinamarca, o uso de fezes suínas como fertilizantes também têm sido associado a casos de ascaridíase em humanos (Nejsun et al., 2005; Roepstorff et al., 2011). Nos países nórdicos, a ascaridíase suína apresenta uma prevalência de 21,5% em suínos em fase de engorda (Roepstorff et al., 1998). Nos Estados Unidos, casos de ascaridíase humana também foram reportados entre trabalhadores de diferentes propriedades rurais, sendo o fator em comum entre os casos o trabalho com suínos (Miller et al., 2015). Apesar do remoto histórico de infecção entre humano-humano por *Ascaris* no sul dos Estados Unidos, nos tempos atuais, acredita-se que o fator causal das infecções sejam os suínos (Anderson, 1995; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017).

As espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* já foram consideradas crípticas por possuírem grande semelhança biológica e morfológica, sendo possível diferenciá-las, apenas por diferenças nos dentículos labiais dos helmintos adultos observados somente através do uso de microscopia eletrônica de varredura. A identificação espécie-específica, através da visualização dos ovos por microscopia óptica é impossível, uma vez que estes são morfológicamente idênticos (Ansel e Thibaut, 1973; Leles et al., 2012; Barbosa, 2015a).

O real cenário da ascaridíase humana e suína, em regiões endêmicas e não-endêmicas, permanece uma incógnita e uma pergunta difícil de ser respondida pelos métodos coproparasitológicos convencionais. Contudo, análises genéticas utilizando diferentes marcadores moleculares têm sido propostas para avaliar o potencial zoonótico de *A. suum*, casos de infecção cruzada e híbridos, e a real epidemiologia da ascaridíase humana e suína, bem como as relações evolutivas de *Ascaris* (Anderson, 1995; Betson et al., 2014; Peng e Criscione, 2012; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017).

## 1.2 Marcadores Moleculares

Marcadores genéticos são caracteres herdáveis, bem caracterizados e que são informativos para identificação e classificação de indivíduos e/ou grupos (Sunnucks, 2000; Mir, 2004; Hayward et al., 2015). Em análises moleculares em geral, a escolha do marcador molecular dependerá da finalidade pretendida (Anderson, 2001; Blouin, 2002).

O DNA ribossomal (DNAr) possui uma família de genes cuja evolução é do tipo conservada, com uma baixa variação intraespecífica (Zhu et al., 2000). Essas sequências possuem centenas de cópias repetidas em tandem, as quais codificam para os genes 18S, 5.8S e 28S, contendo duas regiões denominadas como espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) (Elder e Turner, 1995; De Luca et al., 2004). A região ITS possui sequências fixas e são úteis para o diagnóstico molecular rápido de espécies conhecidas (Blouin, 2002).

No âmbito da ascaridíase, análises comparativas do DNAr compreendendo a região ITS-1, gene 5.8S e ITS-2 de *A. lumbricoides* e *A. suum* demonstraram que a região ITS-2 é idêntica entre as espécies, não sendo informativa para diferenciação (Zhu et al., 1999; Zhu et al., 2000). No entanto, a região ITS-1 possui deleções em determinadas posições na sequência de *A. lumbricoides* e polimorfismos em certas posições no alinhamento entre as duas espécies, totalizando seis posições nucleotídicas divergentes. A soma desses fatores resulta em uma divergência genética de 1,3% entre as sequências nucleotídicas de ITS-1 de *A. lumbricoides* e *A. suum*, com uma variação de até 0,2% dentro do táxon, permitindo diferenciá-las (Zhu et al., 1999; Sadaow et al., 2018; Palma et al., 2019).

As análises a partir do DNAr têm permitido a identificação de diferentes genótipos de *Ascaris*. Peng et al. (2003) verificaram a presença de cinco genótipos (G1-G5) em diferentes regiões da China usando sequências parciais do ITS-1, sendo que o genótipo mais prevalente em amostras isoladas a partir de humanos foi o G1, caracterizado por uma Guanina (G) na posição nucleotídica 133, uma Timina (T) na posição 246 e quatro deleções. Entre os suínos, o genótipo dos isolados de *Ascaris* mais prevalente foi o G3, caracterizado por uma Citosina (C) na posição 133, uma Adenina (A) na posição 246 e uma deleção. A distribuição destes genótipos sugere uma afiliação hospedeiro dependente. Os outros genótipos foram compartilhados por ambas as espécies e apresentaram uma baixa prevalência, sendo um indicativo de hibridização e fluxo gênico limitado. No Brasil, amostras de *Ascaris* isoladas de humanos, apresentam maior prevalência do genótipo G1, no entanto, um novo genótipo foi

encontrado, sendo designado como G6, caracterizado pela deleção de uma timina (T) na posição 127 (T127del) da sequência nucleotídica (Leles et al., 2009).

O uso do marcador ITS-1 também permitiu a identificação de possíveis híbridos em amostras de *Ascaris* isoladas de humanos (Dutto e Petrosillo, 2013; Sadaow et al., 2018) e constatou a infecção cruzada por *A. suum* em humanos no Japão (Arizono et al., 2010).

Segundo alguns autores, as análises baseadas em DNA mitocondrial (DNAMt) são muito informativas para verificar o quanto de identidade ou variação há entre indivíduos de uma mesma população ou mesmo de espécies crípticas (Blouin et al., 1998; Blouin, 2002). Os loci mitocondriais comumente usados são as proteínas do grupo NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide*) desidrogenase (nad) as quais são pouco conservadas; o gene mitocondrial codificador da proteína Citocromo c oxidase (Cox), mais conservado e, em menor escala, o gene Citocromo B (Cyt b) também utilizado nos estudos com *A. lumbricoides* e *A. suum* (Blouin, 2002; Leles et al., 2009; Iñiguez et al., 2012; Liu et al., 2012).

Análises comparativas utilizando o genoma mitocondrial de *A. lumbricoides* e *A. suum* revelaram que as sequências possuem 14.303 pb e 14.311 pb, respectivamente (Liu et al., 2012). Este trabalho foi realizado com amostras originárias da China demonstrando uma identidade genética que variou de 96,6 a 99,5% entre as espécies. Em relação aos genes, foi encontrada uma identidade de 99,2% para a sequência Cox1 e de 97,5% para Nad1 entre as espécies (Liu et al., 2012), resultados semelhantes foram reportados por Zhou et al. (2020<sup>b</sup>). No entanto, essas porcentagens não são absolutas uma vez que foi vista uma pequena variação quando as sequências foram comparadas com o isolado dos Estados Unidos (Liu et al., 2012).

Os marcadores do DNAMt têm revelado um número elevado de haplótipos nas diferentes regiões estudadas, com variados níveis de distribuição na população de *A. lumbricoides* e *A. suum*. O haplótipo H1 tem sido o mais prevalente, seguido pelo H3, principalmente em *Ascaris* isolados de humanos. O haplótipo H64 foi encontrado apenas em *Ascaris* isolados de suínos, enquanto o restante dos 75 haplótipos descritos foram encontrados em *Ascaris* derivados de ambos os hospedeiros, não tendo uma clara segregação geográfica ou de hospedeiro (Betson et al., 2014; Monteiro et al., 2019). No entanto, em regiões simpátricas da Guatemala, foi vista uma clara segregação dos haplótipos de acordo com a origem do hospedeiro (Anderson et al., 1993). Uma discreta ocorrência de haplótipos semelhantes entre as populações de *A. lumbricoides* e *A. suum* também foi notada, fato que, segundo Anderson (2001), poderia ser o resultado de infecção cruzada ou ainda da retenção



de polimorfismos do ancestral comum. Em um estudo realizado em duas cidades, localizadas no estados do Rio de Janeiro e Amazonas, foi constatado que os haplótipos mais prevalentes na população de *Ascaris* isolados de humanos (H14P3 e H12P17, de Cox1 e Nad1 respectivamente), são haplótipos originariamente encontrados em suínos, de acordo com outros estudos, o que pode indicar uma infecção cruzada ocorrendo nessas regiões (Iñiguez et al., 2012). Em menor escala, estudos com DNA antigo de *Ascaris* encontrados em coprólitos também têm sido realizados como mais uma linha de pesquisa, com o intuito trazer luz às relações evolutivas de *Ascaris* ao longo das eras. O marcador mitocondrial Cyt b tem sido um dos marcadores de escolha nessas análises (Loreille et al., 2001; Leles et al., 2008; Oh et al., 2015).

Microsatélites são repetições nucleotídicas curtas (2 a 6 pares de bases), abundantes no genoma nuclear, altamente polimórficas e conjuntamente herdadas por machos e fêmeas (Criscione et al., 2007a; Zhou et al., 2018). Tendo em vista o seu alto polimorfismo, apresentando variações mais recentes no DNA, mas também possibilitando análises retroativas, os microsatélites têm sido muito associados a estudos que visam compreender a introgressão gênica histórica e hibridização contemporânea, as quais, são detectadas de forma eficiente por este marcador (Criscione et al., 2007b). Esse marcador têm sido empregado como uma tentativa de preencher as lacunas no conhecimento sobre a epidemiologia e relações evolutivas de *Ascaris* que não puderam ser totalmente respondidas pelos marcadores mitocondriais e ribossomais (Zhou et al., 2012). Betson et al. (2014), utilizando oito loci de microsatélites constataram que a infecção por *Ascaris* em humanos nos países europeus analisados é majoritariamente zoonótica e que infecção cruzada pode ocorrer em regiões endêmicas, porém em baixa escala (Betson et al., 2014). Em trabalhos desenvolvidos na China, região região endêmica para ascaridíase suína e humana, a utilização de loci de microsatélites possibilitou a constatação da ocorrência de casos de infecção cruzada em humanos por *A. suum* e uma porcentagem considerável de híbridos (Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2018).

A baixa divergência entre as sequências nucleotídicas apontadas por diferentes marcadores, considerada por alguns autores como uma variação intrapopulacional, associada às semelhanças morfológicas e biológicas, fomentam a longa discussão se *A. lumbricoides* e *A. suum* não seriam uma mesma espécie (Leles et al., 2012; Liu et al., 2012; Betson et al., 2014; Alves et al., 2016). Contudo, há indicativos de que sejam espécies reprodutivamente isoladas com ciclos de transmissão separados e baixo fluxo gênico entre as espécies,

apresentando especificidade de hospedeiro, visto principalmente em regiões simpátricas (Anderson, 1993; Cavallero et al., 2013; Soe et al., 2016). Recentemente, um novo sequenciamento do genoma completo de ambas as espécies, focando nas análises de SNPs, mostrou uma clara diferenciação entre as mesmas, indicando que *A. lumbricoides* trata-se de uma população ancentral a *A. suum* (Zhou et al., 2020a).

### **1.3 O desafio diagnóstico no contexto da Ascariíase**

#### *1.3.1 Técnicas Convencionais*

Em virtude do importante problema de saúde pública e potencial zoonótico associado a ascariíase, diversas metodologias têm sido propostas para auxiliar no diagnóstico dessa parasitose. Metodologias baseadas na identificação morfológica das formas imaturas dos diversos parasitos apresentam muitas vantagens, sendo amplamente empregadas na prática clínica e em estudos que visam verificar a prevalência de parasitoses em uma determinada população. Dentre as ferramentas disponíveis, as técnicas de Kato-Katz, com variações no número de lâminas analisadas, Ritchie, Método de McMaster e Hoffman, Pons e Janer (HPJ) são alguns dos métodos utilizados (Sparks et al., 2015; Barbosa, 2015a; Chaves et al., 2015; Korzeniewski, 2016; Inocencio da Luz et al., 2017; Monteiro et al., 2019). No entanto, essas técnicas apresentam algumas limitações devido a quantidade oscilante da liberação dos ovos, baixa carga parasitária do hospedeiro, experiência do microscopista, dentre outros fatores, que podem culminar em resultados incorretos (Chaves et al., 2015; Oliveira et al., 2018).

Pela microscopia eletrônica de varredura, é possível fazer a diferenciação morfológica dos helmintos adultos a partir de caracteres distintos dos dentículos, sendo que em *A. lumbricoides* as extremidades dos dentículos são côncavas e em *A. suum* as extremidades dos dentículos são triangulares (Ansel e Thibaut, 1973; Barbosa, 2015a). Segundo Barbosa (2015a), também é possível fazer essa distinção morfológica por meio da microscopia óptica, após a clarificação por lactofenol. No entanto, para a execução dessas técnicas, além de um microscopista treinado, faz-se necessária a obtenção dos helmintos adultos após a quimio-expulsão.

A análise sorológica foi utilizada por Pinelli et al. (2011) para identificar o agente relacionado a alguns casos suspeitos de larva migrans visceral e ocular na Dinamarca, detectando uma considerável prevalência de *Ascaris*, porém, não sendo possível determinar com precisão a espécie relacionada. Em alguns casos, exames de imagem têm sido

empregados, sem contudo possibilitar a identificação em nível de espécie (Mahmood e Lee, 2010).

### 1.3.2 Técnicas moleculares para genotipagem

Partindo do pressuposto da dificuldade de identificação em nível de espécie utilizando os métodos citados acima, têm sido propostas metodologias que utilizam ferramentas de biologia molecular com o intuito de realizar a identificação das espécies utilizando variantes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A RFLP-PCR (Polimorfismos no Comprimento no Fragmento de Restrição) trata-se de uma técnica que visa a detecção de mutações resultantes de deleções, inserções ou de trocas de bases nucleotídicas que ocorrem nos sítios de reconhecimento das endonucleases de restrição, com consequente perdas ou ganhos de sítios de reconhecimento. A digestão do fragmento amplificado com enzimas específicas podem gerar diferentes padrões de banda entre as sequências analisadas, quando vistas na eletroforese, sendo úteis para o diagnóstico diferencial (Pourzand e Cerutti, 1993; Ota et al., 2007).

Em estudos moleculares relacionados a *A. lumbricoides* e *A. suum* a região ITS do DNAr tem sido um alvo de escolha, dentre outros fatores, por apresentar um sítio de restrição polimórfico para a endonuclease *HaeIII*, útil para a diferenciação das espécies (Nejsun et al., 2005; Dutto e Petrosillo, 2013; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017). Na região ITS-1 de *A. suum* há dois sítios de restrição para a *HaeIII*, enquanto que na sequência de *A. lumbricoides* a mudança transversal de uma citosina por uma guanina (C→G) resultou na perda de um sítio gerando perfis de bandas distintos, a saber: *A. lumbricoides* com duas bandas, *A. suum* com três bandas e híbridos com quatro bandas, sendo que o número de pares de bases de cada fragmento apresentam uma pequena variação entre os trabalhos (Anderson, 1995; Zhu et al., 1999; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017).

Por meio dessa técnica foi possível detectar o perfil correspondente a *A. suum* em uma criança infectada no Zanzibar, porém ciclos de transmissão separados entre *Ascaris* parasitando humanos e suínos no Equador (Sparks et al., 2015). Não foi detectada diferenciação entre *Ascaris* recuperados de humanos e suínos na Dinamarca, os três perfis de banda estavam presentes em proporções variadas, apresentando-se como uma população única (Nejsun et al., 2005). Dados semelhantes a esses últimos foram vistos por Jesudoss-Chelladurai et al. (2017) em *Ascaris* recuperados de suínos nos Estados Unidos.

O Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP-PCR) trata-se de uma variante da PCR que visa a detecção de mutações na sequência-alvo que sofreu um processo de desnaturação após a amplificação, tornando-se um fragmento de DNA de fita simples (ssDNA). Segundo autores, mesmo uma única mutação pontual modifica a conformação da molécula alterando o padrão de migração do ssDNA na eletroforese, quando comparado ao DNA selvagem, diferenciando-os (Orita et al., 1989; Kakavas et al., 2008).

Por meio desta técnica Peng et al. (2003), analisando amostras de *Ascaris* derivados de humanos e suínos de diferentes regiões da China, detectaram a presença de cinco genótipos na população de *Ascaris*. Os autores também avaliaram a distribuição e variabilidade de haplótipos na população de *Ascaris* na China, encontrando 10 haplótipos Cox1 e 11 haplótipos Nad1 para *Ascaris* recuperados de humanos, e 10 e 15 haplótipos Cox1 e Nad1, respectivamente para *Ascaris* recuperados de suínos, com um haplótipo de cada gene sendo o mais prevalente na população e os demais presentes com uma baixa prevalência, com um discreto compartilhamento de haplótipos (Peng et al., 2005). Essa técnica também foi utilizada para a diferenciação entre *A. lumbricoides* e *A. suum* de espécimes oriundos de regiões endêmicas e não endêmicas (Zhu et al., 1999).

A PCR convencional utilizando diferentes marcadores moleculares, seguida pelo sequenciamento e análises das sequências, têm sido o método de escolha para os trabalhos que objetivam estudar os aspectos taxonômicos e evolutivos da população de *Ascaris*, agregando conhecimento sobre a epidemiologia molecular desta parasitose em diferentes regiões do mundo. Essas análises permitem traçar o perfil de distribuição de haplótipos e genótipos em uma dada população e sua possível variação de acordo com a geografia e espécie hospedeira, utilizando principalmente marcadores mitocondriais e loci de microssatélites, possibilitando inferências relacionadas à infecção cruzada, potencial zoonótico de *A. suum* e eventos de hibridização (Iñiguez et al., 2012; Snábel et al., 2012; Zhou et al., 2012; Monteiro et al. 2019).

Betson et al. (2014) desenvolveram uma análise em grande escala para diferenciação genética das amostras de *Ascaris* adultos de humanos e suínos oriundas de regiões da Europa, Ásia, África e América Latina. Além da riqueza de haplótipos encontrada, os autores verificaram que a população de *Ascaris* obtidos de humanos residentes no Reino Unido e Dinamarca eram muito semelhantes aos haplótipos de *Ascaris* recuperados de suínos e ainda, reportaram infecção cruzada em alguns países da África.

A real-time PCR (qPCR) é uma variante da técnica que permite a detecção e quantificação em tempo real do DNA amplificado por meio do uso de moléculas repórter que emitem uma fluorescência cuja intensidade é proporcional aos amplicons produzidos em cada fase do ciclo (Pecson et al., 2006; Easton et al., 2017; Acosta Soto et al., 2017). Shao et al. (2014) realizaram uma análise comparativa dos perfis de microRNA (miRNA) de *A. lumbricoides* e *A. suum* por meio de uma transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR). Os autores verificaram uma considerável similaridade nos perfis de miRNA com um discreto percentual de perfis espécie-específicos (4,35%), sugerindo que ambas as espécies constituem, na verdade, um mesmo táxon.

A Multiplex-PCR é uma técnica que permite a detecção de diferentes marcadores simultaneamente para uma mesma amostra em uma única reação, resultando na redução de tempo e custos. O desenho dos primers é um fator determinante para o sucesso da PCR e para facilitar as análises pós-reação (Zhang et al., 2015; Bangratz et al., 2020). No âmbito da ascaridíase, Carlsgart et al. (2009) realizaram a padronização desta técnica para dois alvos moleculares distintos, a saber, ITS-1 para identificação da espécie de *Ascaris* e o alvo COX-1 para análises de genética de população a partir de DNA de ovo não embrionado, os autores conseguiram amplificar simultaneamente os dois alvos.

A detecção de SNPs em uma determinada sequência como caráter de diagnóstico diferencial tem sido amplamente empregada, especialmente na detecção de mutações associadas a doenças genéticas (Avanus e Altinel, 2017; Toye et al., 2018). Dentre as variantes da técnica de PCR desenvolvidas, a PCR alelo-específico (AS-PCR) tem sido uma técnica amplamente utilizada para a genotipagem de SNPs (Bundock et al., 2006; Gaudet et al., 2009; Lefever et al., 2019). A técnica consiste na construção de primers específicos ao SNP buscado, primers estes que apresentam um nucleotídeo na posição -1 da extremidade 3' que é complementar ao sítio do SNP de interesse. Para aumentar a especificidade dos primers, sugere-se a adição de uma incompatibilidade próximo à extremidade 3' do primer (Gaudet et al., 2009). Associa-se o emprego da *Taq* DNA polimerase convencional, a qual não apresenta atividade 3'-5' exonuclease, permitindo que a incompatibilidade permaneça. Consequentemente, o pareamento do primer contendo a incompatibilidade à sequência de DNA não-alvo resultará na impossibilidade de amplificação (Gaudet et al., 2009; Lefever et al., 2019). No entanto, apesar das vantagens da AS-PCR, essa técnica ainda não foi utilizada para genotipagem de *A. lumbricoides* e *A. suum*. O Quadro 1 apresenta as técnicas que têm

sido utilizadas para genotipagem de *A. lumbricoides* e *A. suum*, bem como os seus respectivos alvos moleculares.

**Quadro 1** - Técnicas e alvos moleculares usados na identificação e em estudos epidemiológico-moleculares com *A. lumbricoides* e *A. suum*.

<b>Técnica</b>	<b>Alvo Molecular</b>	<b>Referência</b>
RFLP-PCR	DNA <sub>m</sub>	Anderson et al. (1993)
	ITS-1 e ITS-2	Anderson (1995); Nejsun et al. (2005); Leles et al. (2009); Sparks et al. (2015); Dutto e Petrosillo (2013); Cavallero et al. (2013); Jesudoss-Chelladurai et al. (2017); Palma et al. (2019).
SSCP-PCR	ITS-1 e ITS-2	Zhu et al. (1999) e Peng et al. (2003)
	COX-1 e Nad-1	Peng et al. (2005)
PCR Convencional	COX-1 e Nad-1	Iñiguez et al. (2012); Sadaow et al. (2018); Barbosa (2015a) e Monteiro et al. (2019).
	ITS-1	Arizono et al. (2010); Leles et al. (2010); Barbosa (2015a) e Sadaow et al. (2018).
	Microssatélites	Criscione et al. (2007); Betson et al. (2011); Betson et al. (2014); Zhou et al. (2012) e Zhou et al. (2018).
Long-PCR	DNA <sub>m</sub>	Liu et al. (2012)
Real Time- PCR	microRNA	Shao et al. (2014)
Multiplex-PCR	Cox-1 e ITS-1	Carlsgart et al. (2009)

## 2 JUSTIFICATIVA

A ascaridíase humana trata-se de uma doença infecciosa e negligenciada, cujo agente etiológico é o helminto parasito *A. lumbricoides*. Essa doença afeta uma grande parcela da população mundial, principalmente indivíduos residentes nos países em desenvolvimento. A infecção por *A. lumbricoides* é diretamente associada à deficiência ou ausência de saneamento básico, práticas de higiene precárias e indivíduos vivendo em situação de pobreza. Contudo, existem relatos crescentes de infecção por *Ascaris* em países cujos dados de ascaridíase humana eram baixos ou mesmo inexistentes. Neste âmbito, análises feitas a partir da genotipagem de espécimes de *Ascaris* têm demonstrado que *A. suum* tem sido a espécie identificada nesses locais, sendo os suínos uma importante fonte de infecção.

As infecções cruzadas experimentais e naturais reportadas em diferentes regiões, o encontro de uma grande variedade de haplótipos demonstrando a diversidade genética de *Ascaris*, o fluxo gênico entre as espécies gerando híbridos e suas implicações, são alguns dos fatores que revelam o grande potencial zoonótico da infecção por *A. suum*. Por conseguinte, estudos em epidemiologia molecular e testes para a determinação das espécies de *Ascaris* são fundamentais para detectar as fontes de infecção e a real prevalência da ascaridíase entre humanos e animais.

Os trabalhos que visam o desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares para determinação das espécies têm ressaltado a importância dessas ferramentas para verificar a diversidade genética, epidemiologia da infecção e o potencial zoonótico de *A. suum*. No entanto, dentre os trabalhos publicados, muitos utilizam principalmente helmintos adultos obtidos de seres humanos após a quimio-expulsão e de suínos após o abate, sendo um processo muito laborioso para a prática clínica. As técnicas coproparasitológicas classicamente empregadas fazem a identificação a partir de ovos encontrados nas fezes, contudo, sem a capacidade de realizar a identificação em nível de espécie. Dessa forma, o presente trabalho visa a padronização de uma técnica, PCR alelo- específica, ainda não utilizada para estudos com *Ascaris*, para a genotipagem de *A. lumbricoides* e *A. suum* a partir da extração de DNA de ovo único presentes em amostras de fezes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Padronizar e aplicar uma metodologia baseada em reação em cadeia da polimerase (PCR) espécie-específica para diferenciação de *A. lumbricoides* e *A. suum*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Sintetizar controles contendo sequências específicas de *A. suum* e de *A. lumbricoides* para serem usados na PCR;
- Realizar a varredura em ovos de *Ascaris* para identificação de espécies, obtidos a partir de fezes de humanos de sete estados do Brasil;
- Aplicar a técnica PCR espécie-específica para a análise de 84 ovos de *Ascaris* provenientes das fezes de suínos oriundos de duas propriedades localizadas no estado de Minas Gerais;
- Validar o teste molecular padronizado por meio de sequenciamento.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Comitê De Ética

O trabalho desenvolvido com amostras de humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - COEP (CAAE 61047216.7.0000.5149) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Não foram obtidas identificações dos participantes e os dados foram analisados anonimamente.

### 4.2 Obtenção, processamento e extração de DNA de ovos

As amostras de fezes humanas utilizadas neste trabalho são provenientes dos seguintes estados brasileiros: Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí, Sergipe, Tocantins e de Minas Gerais, conforme listado no Quadro 2. Essas amostras sabidamente positivas para *Ascaris* foram enviadas por colaboradores de laboratórios clínicos e não obteve-se acesso ao histórico clínico dos pacientes.

**Quadro 2** - Dados das amostras de humanos genotipadas no estudo.

Estado	Nº de pacientes	Nº de ovos
Bahia	7	97
Ceará	16	197
Maranhão	13	169
Piauí	10	129
Minas Gerais	7	107
Sergipe	3	57
Tocantins	12	162
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	<b>918</b>

No presente trabalho, como um meio de validação da técnica, também foram genotipados ovos de *Ascaris*, provenientes de fezes de suínos de duas propriedades localizadas na cidade de Sabará, Minas Gerais, conforme listado no Quadro 3. As amostras foram armazenadas em formaldeído 10% e encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB-UFMG, sendo processadas como descrito a seguir.

**Quadro 3** - Descrição das localidades, número de suínos e quantidade de ovos que foram genotipados no estudo.

<b>Local</b>	<b>ID suíno</b>	<b>Nº de ovos</b>
Propriedade 1	MG-P1	4
	MG-P2	10
	MG-P3	3
	MG-P4	32
	MG-P5	15
Propriedade 2	MG-P6	20
<b>TOTAL</b>	<b>06</b>	<b>84</b>

A recuperação dos ovos foi realizada seguindo o método de Ritchie (1948) com modificações feitas por Zuccherato et al. (2018). A saber: 2 mL da suspensão de fezes foram homogeneizadas e filtradas através de gaze em tubo do tipo Falcon de 15 mL. Ao filtrado, foi adicionado 5 mL de éter sulfúrico seguido por vigorosa agitação e centrifugação por 1 min a 14.000 xg. O sobrenadante foi descartado. Foi adicionado ao sedimento 500 µL de hipoclorito de sódio 5% por 10 minutos, seguido por centrifugação a 14.000 xg e descarte do sobrenadante. O pellet foi novamente lavado com 500 µL de água ultrapura, centrifugação a 14.000 xg e descarte do sobrenadante. Ao sedimento foram adicionados 500 µL de ácido sulfúrico 0,2 N e posterior incubação em banho-maria a 30 °C por 30 dias para desenvolvimento da larva. Após este período, a amostra foi centrifugada a 14.000 xg e o sobrenadante descartado.

Um novo passo de lavagem foi feito com ressuspensão da amostra com 500 µL de água ultrapura, centrifugação a 14.000 xg e descarte do sobrenadante. Cada amostra foi levada ao microscópio, foram adicionados 500 µL de hipoclorito de sódio 1% ao sedimento e o material foi acompanhado até que a membrana intermediária, que reveste o ovo, começasse a se desintegrar.

Após este passo, o material foi lavado com água ultrapura, por três vezes, para retirada da solução de hipoclorito. Os ovos foram separados individualmente com o auxílio de uma pipeta em um volume final de 2 µL e transferidos para tubos do tipo eppendorf de 0,6 mL contendo 10 µL de solução de tampão de lise (50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH 8.3, MgCl 22,5 mM, 0,45% de Nonidet e Proteinase K 100 mg/mL), descrito por Lake et al. (2009) e

modificado por Diawara et al. (2013). Os ovos foram incubados por 2 h a 56 °C, para isolamento do DNA genômico, e posteriormente a 95 °C por 20 min, para a inativação da proteinase K. O DNA obtido nesta solução foi usado nas reações de PCR, e os tubos foram armazenados a 4 °C até o momento do uso.

#### **4.3 Extração e dosagem de DNA de helminto adulto**

No intuito de construir controles positivos para a PCR, foram extraídos DNA de helmintos adultos de *A. lumbricoides* e *A. suum*. Adicionalmente, foi realizada a extração de DNA de três helmintos, expelidos por um suíno, para confirmação da espécie. A extração de DNA foi desenvolvida de acordo com protocolo padronizado no Laboratório de Parasitologia Molecular do ICB/UFMG. Primeiramente, os helmintos foram colocados em tubos individuais e submersos em nitrogênio líquido, seguido por maceração com pistilo de vidro. Foram adicionados 400 µL de tampão de lise (50 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl e SDS 10%), seguido por digestão com proteinase K (Promega, USA), a 65 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 e centrifugação a 12.000 xg a 25 °C por 5 min. Após, a fase superior foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a qual foi digerida com 100 µg/mL de RNase A (Ludwig Biotec, Brasil) a 37 °C por 30 min. Novamente foram adicionados 400 µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico e centrifugação a 12.000 xg a 25 °C por 5 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL com adição de 400 µL de isopropanol. O precipitado de DNA resultante foi armazenado a -20 °C. Após aproximadamente 16 h, o tubo foi centrifugado a 14.000 xg a 4 °C por 30 min. Foram adicionados 400 µL de etanol 70% e centrifugação a 12.000 xg a 4 °C por 10 min. Essa etapa de lavagem foi repetida e o DNA foi ressuspensão em água ultrapura e armazenado a 4 °C. O DNA foi dosado por espectrofotometria por meio do aparelho Nanodrop® ND-100 (Thermo Scientific, USA) levando-se em consideração a relação 260/280 e 260/230 para controle de qualidade.

#### **4.4 Desenho dos primers**

Os primers utilizados para as análises foram desenhados através do programa Oligo Explorer 1.4 (Gene link, Estados Unidos), baseando-se nas sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), as quais apresentaram uma alta similaridade com outras sequências de *A. lumbricoides* e *A. suum*, sob número de acesso LC422642.1 e KY964445.1 para *A. lumbricoides* e *A. suum*,

respectivamente, ambas referentes à sequência de ITS-1 de cada espécie. A nomenclatura designada para cada primer foi escolhida de acordo com o sentido seguido pelo primer - (F) Forward e (R) Reverse - e a espécie no qual ele se anelará de forma espécie-específica (*A. lumbricoides*: F.AI; *A. suum*: F.As). Para os controles positivos da reação, foram desenhados primers que se anelam em ambas as sequências, sendo designado como F.both. O primer reverse utilizado nas reações foi o mesmo para ambas as espécies, pois se anela em uma região comum entre as espécies, sendo designado como R.both. Conforme preconizado por Gaudet et al. (2009), para aumento da especificidade dos primers, foram realizadas substituições de bases para aplicação da metodologia de AS-PCR. Nesse trabalho as substituições foram realizadas na posição 4 na extremidade 3' terminal, de acordo com Furtado e Rabelo (2014). O Quadro 4 apresenta todos os primers utilizados nessa pesquisa.

**Quadro 4** - Primers para diagnóstico diferencial de *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*.

Primers	Sequência (5'-3')	Substituição
F.AI	GCG GTT TCT TTT TTT TTT <b>CGC</b> G	G → C
F.As	GAG AAA GCT CCT CGT <b>TGC</b> GG	T → G
F.both	TGG TGA TGT AAT AGC AGT CG	-
R.both	CCA CGA ACC GAG TGA TCC AC	-

Em negrito são mostrados os locais de alterações feitas nos primers.

#### 4.5 Controles

Para padronização da técnica e uso nas reações, controles positivos para *A. lumbricoides* (C.AI) e para *A. suum* (C.As) foram sintetizados artificialmente, contendo as sequências da região ITS-1. Para tal intento, a partir do DNA genômico de *A. lumbricoides* e *A. suum*, previamente extraídos da forma adulta, foram realizadas PCRs convencionais, em volume final de 10 µl, contendo 0,2 µM dos primers F.both + R.both (392 pb), *Taq* DNA polimerase (1 U) (Phoneutria, Brasil), trifosfato de desoxinucleosídeo (dNTPs) (200 µM cada), tampão de reação (1 X), 1µL (~30 ng) de DNA e água ultrapura. As amplificações foram realizadas seguindo o seguinte programa: 95 °C por 5 min para desnaturação inicial da dupla fita de DNA, 30 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 45 s, seguido de 72 °C por 45 s e um passo final de extensão a 72 °C por 8 min. Nas reações, foram incluídos o “branco”, com a substituição do DNA por água, para avaliar a presença de possíveis contaminantes. Os

produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em agarose 2% (m/v) e corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos). Para cada espécie, a amplificação gerou fragmentos de 392 pb, os quais foram purificados (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK) e a concentração foi determinada conforme explicado no item 4.3.

#### 4.6 Clonagem

Os controles positivos foram clonados usando o kit pGEM-T Easy Vector System (Promega, EUA). O volume de 1,5 µL do produto de PCR foi adicionado a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 2,5 µL do tampão de ligação, 0,5 µL do vetor plasmidial e 0,5 µL de T4 DNA ligase. Essa reação foi incubada a 4°C por 16 h. Posteriormente, para a transformação, 2 µL do produto de clonagem foram adicionados em 30 µL das células da linhagem XL-1 blue (Phonutria, Brasil) e mantidas no gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 42 °C por 1,5 min e novamente transferidas para o gelo por 2 min. Essas células foram incubadas a 37 °C por 1 h em 500 µL de meio líquido circlegrow (MP Biomedicals, USA), e posterior plaqueamento neste mesmo meio contendo Ampicilina (100 µL/ mL), IPTG (100 mM) e X-gal (500 µg/ mL). As placas foram incubadas a 37 °C, overnight. A confirmação da presença do inserto de interesse nos plasmídeos ocorreu por meio da PCR de colônia, utilizando uma pequena amostra das colônias brancas que foram coletadas com um palito de madeira estéril. As amostras foram transferidas para um tubo contendo 5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 0,2 µL de cada primer na concentração final de 0,2 µM, M13 forward (5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC- 3') e reverse (5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C – 3') (Boutin-Ganache et al., 2001) e 4,6 µL de água ultrapura. Igualmente, foram realizadas reações de PCR com as colônias azuis as quais serviram como o controle negativo da clonagem. A PCR de colônia ocorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, anelamento dos primers a 52 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 8 min. O produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com tampão TAE 0,5x e corado com GelRed (Biotium, USA).

As colônias positivas na reação de PCR foram inoculadas em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio circlegrow e 3µL de Ampicilina (100 µL/ mL), os quais foram incubados a 37 °C por aproximadamente 15 h, sob agitação constante (5.000xg).

#### 4.7 Recuperação do DNA plasmidial

Para a recuperação do DNA plasmidial foi utilizado o kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 xg em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Sobrenadante foi descartado e a cultura restante foi novamente centrifugada. O sobrenadante foi removido por inversão e o pellet foi ressuspensão em 250 µL de solução de ressuspensão de célula. Para romper a membrana bacteriana, 250 µL de solução de lise foram adicionados com 10 µL de protease alcalina para quebra de ligações peptídicas. Foram adicionados 350 µL de solução de neutralização e o produto foi incubado a temperatura ambiente por 5 min. O lisado bacteriano foi centrifugado a 14.000 xg por 10 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 14.000 xg por 1 min em temperatura ambiente. O líquido do tubo coletor foi descartado e a coluna foi reinserida. O procedimento de lavagem foi repetido usando 250 µL de solução de lavagem, centrifugação 14.000xg por 2 min em temperatura ambiente. A coluna foi inserida em um novo tubo coletor, o DNA plasmidial foi eluído em 40 µL de água ultrapura e o DNA estocado a -20 °C.

#### 4.8 Determinação espécie-específica

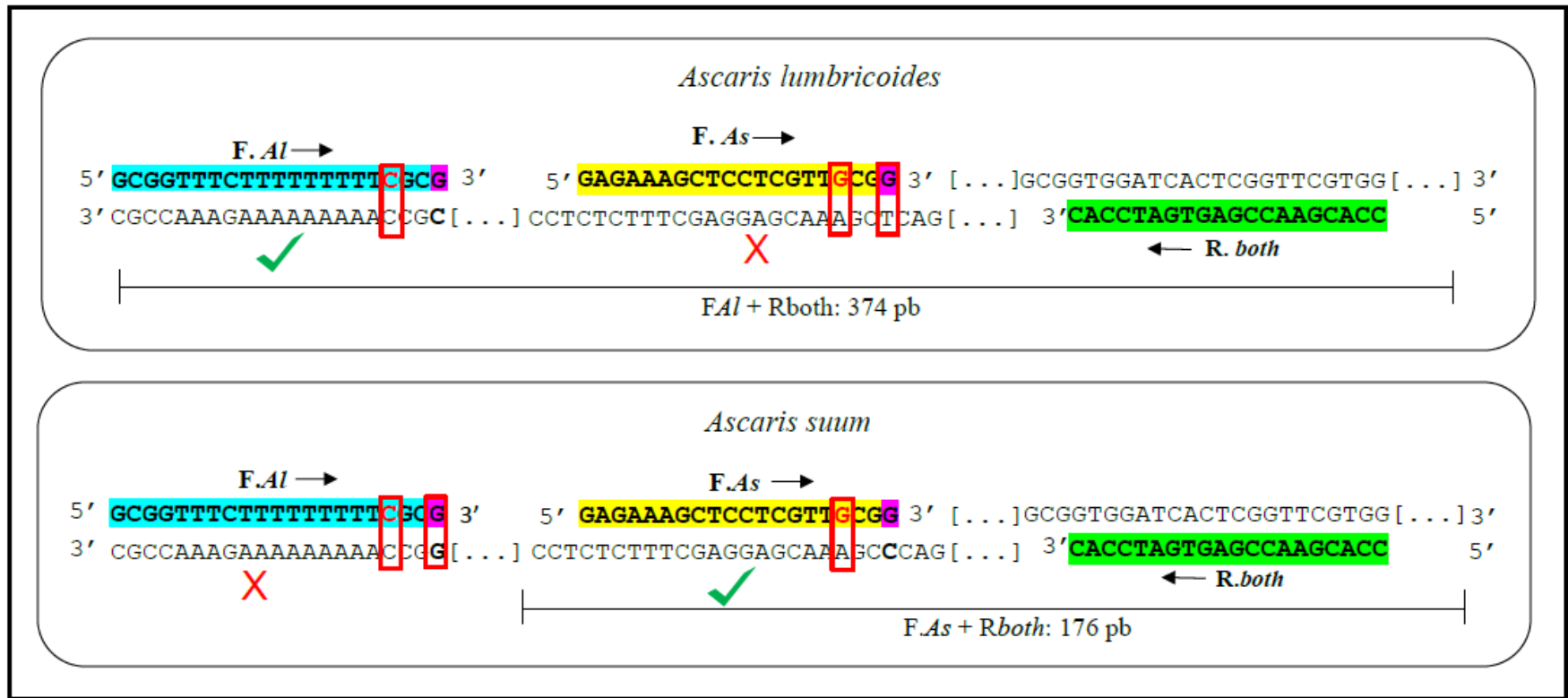
Para determinação espécie-específica, foi desenvolvida uma metodologia baseada na técnica de AS-PCR. Essa técnica foi escolhida por possibilitar a detecção simultânea de SNPs úteis para a genotipagem. Cada primer foi desenhado para anelar-se a uma região diferente entre as espécies, regiões estas que possuem uma alta identidade entre as espécies, mas que contêm SNPs úteis para diferenciá-las, resultando em fragmentos de tamanhos diferentes.

O primer F.A1, desenhado para *A. lumbricoides*, possui uma G na extremidade 3' terminal a qual pareia-se com uma C na sequência nucleotídica do DNA do helminto. Na sequência de *A. suum*, nesta mesma posição há uma G, sendo assim, presumisse que esta incompatibilidade inibiria o anelamento do primer F.A1 a esta sequência. O primer F.A2 foi desenhado para uma outra região, o qual na extremidade 3' terminal há uma G que anela-se a C da sequência nucleotídica de *A. suum*. Nesta mesma região na sequência de *A. lumbricoides* há uma T na extremidade 3', tratando-se de uma incompatibilidade que poderia impedir o anelamento. No entanto, haja vista a alta similaridade entre as sequências nucleotídicas das duas espécies, a presença de apenas uma base nucleotídica divergente entre as sequências poderia não ser o suficiente para inibir um anelamento inespecífico. Sendo assim, conforme

descrito por Furtado e Rabelo (2014), uma segunda incompatibilidade foi adicionada na posição 4 da extremidade 3' dos primers F.A1 e F.As para garantir um anelamento específico dos mesmos.

Todas as PCRs foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo os três primers (0,2 µM cada) que apresentam a região do ITS-1 como alvo, *Taq* DNA polimerase (1 U) (Phoneutria, Brasil), trifosfato de desoxinucleosídeo (dNTPs) (200 µM cada), tampão de reação (1 X) , 5 µl de DNA de ovo individual (não quantificado anteriormente para evitar a perda de material) e água ultrapura. As amplificações obedeceram ao mesmo programa descrito no item 4.5. Dentre as amostras a serem analisadas, foram incluídos os controles positivos sintetizados e o “branco”. Os produtos dessas reações foram submetidos à eletroforese em agarose 2% (m/v) e corados com GelRed® (Biotium, Estados Unidos).

A técnica em questão foi padronizada de maneira que os tamanhos dos fragmentos gerados possibilitam a diferenciação de *A. lumbricoides* e *A. suum*. Assim, os primers forwards F.A1 e F.As foram desenhados para anelar-se no DNA de *A. lumbricoides* e *A. suum*, respectivamente. O primer reverse R.both foi desenhado para anelar-se no DNA de ambas as espécies. No caso da espécie em análise ser *A. lumbricoides*, a combinação F.A1 + R.both resultou em um fragmento de 374 pb, enquanto que, para *A. suum*, a combinação F.As + R.both resultou em um fragmento de 176 pb. Essa técnica permitiu que em uma mesma reação, ambas as espécies possam ser detectadas a partir do DNA de ovo único. Na Figura 2 é mostrado um esquema representativo da técnica padronizada.



**Figura 2-** Esquema adotado para diferenciação molecular das espécies *A. lumbricoides* e *A. suum*. Os primers forward *FAl* e *FAs* foram desenhados para se anelar no DNA de *A. lumbricoides* e *A. suum*, respectivamente. O primer reverso *R.both* foi desenhado para se anelar no DNA de ambas as espécies (*A. lumbricoides*: *FAl* + *Rboth* = 374 pb; *A. suum*: *FAs* + *Rboth* = 176 pb). As caixas em vermelho correspondem aos locais de incompatibilidade dos primers em cada situação. As bases nucleotídicas marcadas de rosa nas sequências de *Ascaris* . correspondem aos SNPs. As bases nucleotídicas em vermelho nos primers são incompatibilidades adicionadas para aumentar a especificidade.



#### 4.9 Purificação do DNA

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX® PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare, UK), de acordo com recomendação do fabricante. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, a banda foi retirada do gel, transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e pesada em balança semianalítica. Para cada 10 mg de gel foram adicionados 10 µL do tampão de captura, seguido de incubação a 60 °C até dissolver totalmente. A mistura foi levada ao vórtex, em seguida foi transferida para uma coluna inserida em um tubo coletor e incubada por 1 min a temperatura ambiente, seguida por centrifugação a 16.000 xg por 30 s para ligação do DNA à membrana da coluna. O filtrado foi descartado e a coluna foi reinserida no tubo. Foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem na coluna, centrifugação a 16.000 xg por 30 s, a fim de possibilitar a remoção de sais e contaminantes da membrana. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi inserida em tubo de microcentrífuga para de 1,5 mL para eluição do DNA. Foram adicionados 15 µL do tampão de eluição no centro da coluna, com posterior incubação a temperatura ambiente por 1 min e centrifugação a 16.000 xg por 1 min. O DNA eluído foi estocado a -20 °C.

#### 4.10 Sequenciamento

A fim de validar a metodologia padronizada, os controles positivos e 25 amostras escolhidas aleatoriamente foram sequenciadas. Foi realizada uma PCR convencional utilizando os primers *F.both* e *R.both*, com volume final de 25 µL, seguindo as condições de reação e concentrações mencionadas no item 4.5. As duplicadas referentes a uma mesma amostra foram transferidas para o mesmo tubo, purificadas conforme descrito no tópico 4.10

Os produtos amplificados resultantes foram sequenciados de acordo com o método descrito por Sanger et al. (1977). As reações foram realizadas utilizando o kit DYEnamic® ET dye terminator cycle sequencing (GE Healthcare, UK) e foram realizadas em placas de 96 poços em um volume final de 10 µL contendo 0,5 µL de cada primer, aproximadamente 80 ng do fragmento de DNA purificado, 4 µL de ET kit e completou-se com água ultrapura. As reações foram realizadas no termociclador seguindo as seguintes condições: 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Em seguida, os nucleotídeos não incorporados foram retirados pela adição de 1µL de acetato de amônio (7,5M), 25 µL de etanol absoluto e incubação a 25 °C por 15 min, seguido de centrifugação a 4.000 xg por 45 min a 25 °C. Descartou-se o sobrenadante e 150 µL de etanol 70% foram adicionados às amostras, seguido

de centrifugação a 4.000 xg por 15 min a 25°C. Seguiu-se com o descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento por agitação em vórtex com 10 µL do tampão de solubilização contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram lidos no sequenciador automático capilar MegaBACE 1000® Long Read Matrix (GE, Healthcare, UK) com injeção de 2 kV por 100 s e corrida de 6 kV por 240 min. Cada amostra foi sequenciada nos sentidos forward e reverse e o software Sequence Scanner® (Life Technologies, USA) foi utilizado para análises do cromatograma.

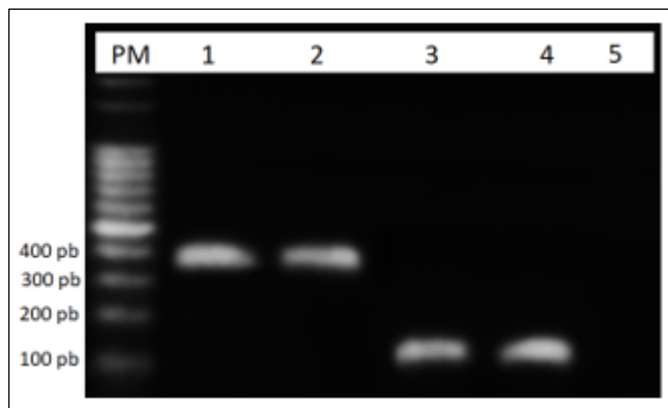
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Padronização da técnica PCR espécie-específica para a genotipagem de *A. lumbricoides* e *A. suum*

Visando a padronização de uma técnica para a genotipagem de *Ascaris* a partir de DNA de ovo único, a técnica AS-PCR foi escolhida como base por possibilitar a detecção de polimorfismos que são úteis como marcadores para um diagnóstico diferencial entre as duas espécies. Foram desenhados primers forward específicos para cada espécie, a saber: primers F.A1 e F.As, específicos para a sequência ITS-1 de *A. lumbricoides* e *A. suum*, respectivamente, e o primer reverse R.both, que anela-se nas sequências de ambas as espécies. Seguindo o conceito da técnica, o primer específico para uma espécie não se anelaria na outra espécie, devido a base nucleotídica divergente na posição -1 da extremidade 3' terminal, impossibilitando o anelamento inespecífico dos primers. Para aumentar a especificidade das reações, mais uma incompatibilidade foi inserida na posição -4 da extremidade 3' terminal. Consequentemente, as duas incompatibilidades inibem o anelamento do primer à sequência não-alvo. Todavia, o primer específico à sequência de interesse contém apenas uma incompatibilidade, a qual não afeta o anelamento e a consequente amplificação da sequência. A padronização da técnica PCR espécie-específica para genotipagem de *A. lumbricoides* e *A. suum* resultou em um depósito de patente, conforme pode ser visto no Anexo desta dissertação.

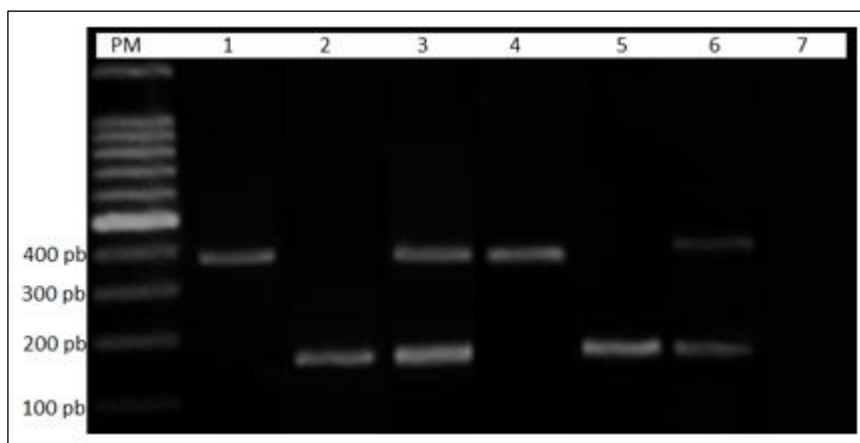
Conforme proposto, foram sintetizados controles positivos, denominados como C.A1 e C.As, para a padronização da técnica e uso nas reações, por meio de clonagem, a partir do DNA de helmintos adultos. A fim de avaliar a eficiência dos primers e verificar a qualidade do DNA plasmidial comparado ao DNA genômico, foi realizada uma PCR, utilizando os três primers em uma mesma reação, seguindo as condições anteriormente citadas no item 4.5.

Na Figura 3 é mostrado o gel contendo o produto de PCR utilizando os controles positivos a partir do DNA plasmidial e os controles positivos utilizando o DNA genômico extraído da forma adulta de *Ascaris*. Por meio desse gel, é possível notar que os controles resultantes de ambos os processos geraram bandas igualmente bem definidas e visíveis em gel e que os primers se anelaram de forma específica gerando fragmentos de tamanhos claramente distintos, diferenciando as espécies.



**Figura 3** - Análises para padronização da técnica utilizando plasmídeos e DNA genômico de *A. lumbricoides* e *A. suum* adulto. Eletroforese em gel de agarose 2% corado por gelred. PM: peso molecular. Nas canaletas de 1 a 4 foram aplicados produtos de PCR espécie-específica. Nas canaletas 1 e 3 foram utilizados plasmídeos como controles positivos template da reação (1: *A. lumbricoides*; 3: *A. suum*), canaletas 2 e 4 foram utilizados DNA genômico de helminto adulto como template da reação (2: *A. lumbricoides*; 4: *A. suum*). A canela 5 apresenta o “branco”. Amplicons esperados - *A. lumbricoides*: 374 pb; *A. suum*: 176 pb.

Após verificar a amplificação específica bem sucedida dos primers com os controles positivos clonados, mimetizando o que ocorreria em casos de uma monoinfecção, verificou-se como os primers se comportariam, em casos de haver uma amostra de DNA que contenha os dois SNPs, um específico para cada espécie, tratando-se de um possível híbrido. Na Figura 4, é mostrado o comportamento dos primers em uma PCR em que foram utilizados os controles positivos C.A1 e C.As em uma mesma reação, mimetizando um possível híbrido, bem como um teste inicial para análise de DNA de ovo único. Esse gel evidencia a especificidade igualitária dos primers, não havendo uma competição entre os mesmos, pois foi possível detectar claramente as duas bandas, referentes a cada espécie. As outras amostras também foram amplificadas com sucesso.



**Figura 4** - Avaliação da especificidade dos primers. Eletroforese em gel de agarose 2% corado por gelred. PM: peso molecular. Nas canaletas de 1 a 7 foram aplicados produtos de PCR espécie-específica, utilizando os primers F.Al + F.As + R.both na mesma reação. Os primers F.Al e F.As foram desenhados para se anelar no DNA de *A. lumbricoides* e *A. suum*, respectivamente, enquanto o primer R.both foi desenhado para se anelar no DNA de ambas as espécies (*A. lumbricoides*: F.Al + R.both = 374 pb; *A. suum*: F.As + R.both = 176 pb). Nas canaletas 1 a 3 foram utilizados controles positivos como template da reação (1: *A. lumbricoides*; 2: *A. suum*; 3: Mix de *A. lumbricoides* e *A. suum*). Nas canaletas 4 a 6 (4: *A. lumbricoides*; 5: *A. suum*; 6: Mix de *A. lumbricoides* e *A. suum*) foram aplicados produtos de PCR utilizando DNA genômico de ovo único. A canaleta 7 apresenta o “branco”.

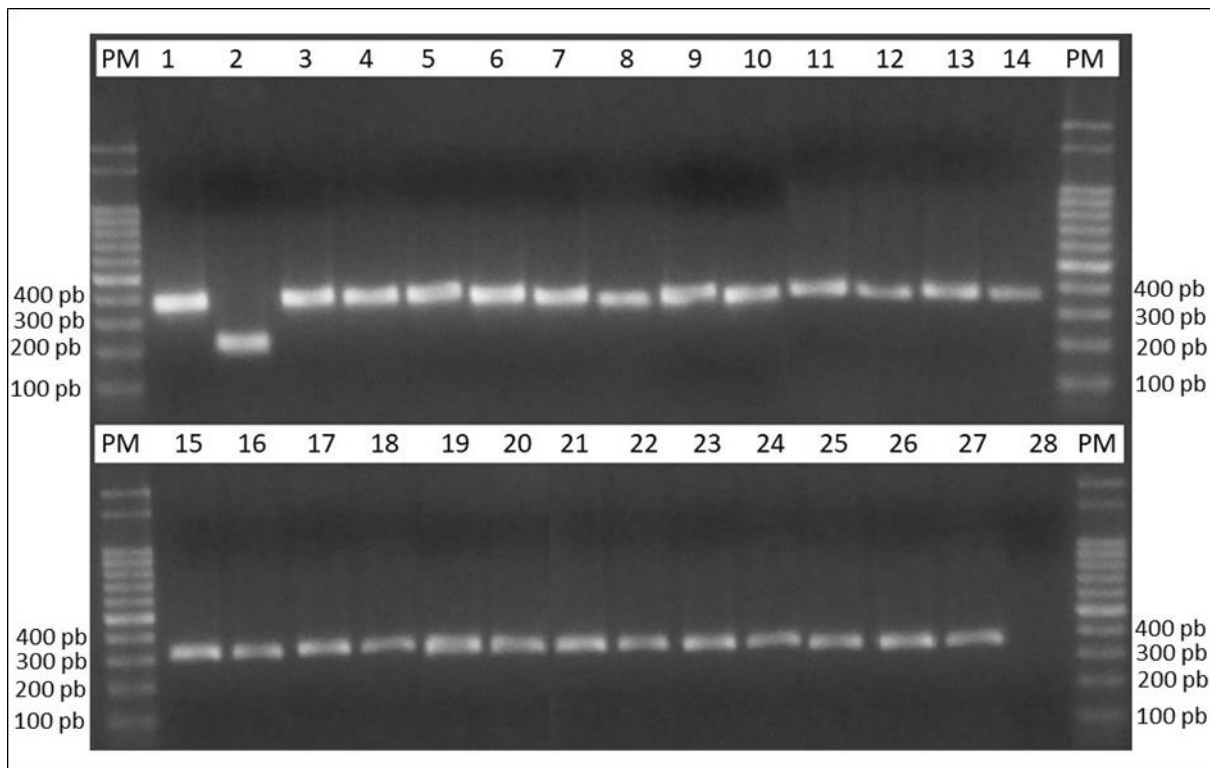
## 5.2 Varredura de ovos de *Ascaris* em amostras de fezes humanas

Padronizada a técnica, seguiu-se com a varredura dos ovos de *Ascaris* obtidos de fezes humanas de 68 indivíduos oriundos de sete estados brasileiros, dispendo na amostragem, representantes das regiões norte, nordeste e sudeste. No total, foram recuperados 918 ovos de *Ascaris* os quais foram submetidos à genotipagem por meio da técnica PCR espécie-específica. Dos 918 ovos amostrados, 863 DNA de ovos foram amplificados com sucesso, uma média de aproximadamente 94%, conforme visto no Quadro 5.

**Quadro 5** - Número de ovos recuperados e amplificados por pacientes em cada estado.

Estado	Nº de pacientes	Total de ovos	Ovos por paciente (Mínimo e Máximo)	Nº de amostras amplificadas (Mínimo e Máximo)	Nº total amplificado
Bahia	07	97	10 e 18	09 e 18	84
Ceará	16	197	10 e 15	07 e 15	187
Maranhão	13	169	08 e 18	04 e 16	138
Piauí	10	129	10 e 18	10 e 18	128
Sergipe	03	57	12 e 24	12 e 24	56
Minas Gerais	07	107	12 e 24	12 e 24	107
Tocantins	12	162	9 e 19	9 e 19	162
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>918</b>			<b>862</b>

A Figura 5 apresenta um gel demonstrativo, contendo 25 amostras, das 862 amplificadas. Todas as amostras amplificadas de ovos de *Ascaris* recuperados de fezes humanas, quando vistas em gel de eletroforese, apresentaram o padrão de banda compatível com o controle positivo C.AL, sendo portanto, identificados como ovos de *A. lumbricoides*.



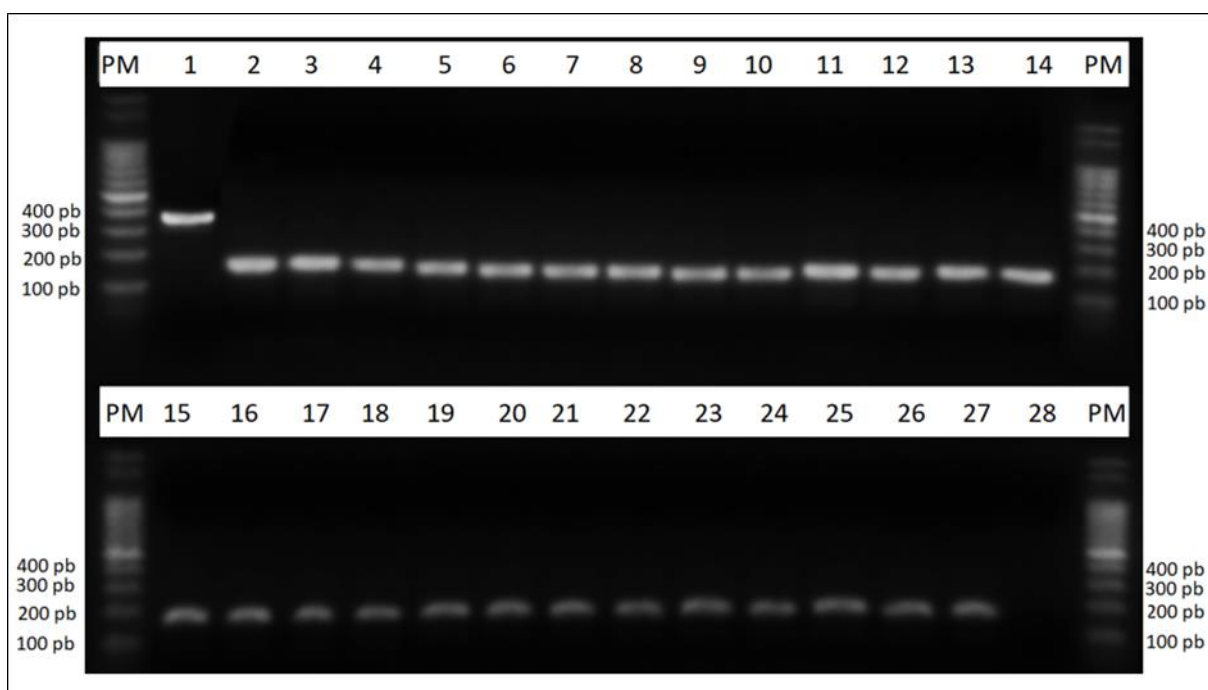
**Figura 5** - Varredura para diferenciação molecular de *A. lumbricoides* e *A. suum* de amostras humanas. Eletroforese em gel de agarose 2% corado por gelred. PM: peso molecular. Nas canaletas de 1 a 28 foram aplicados produtos de PCR espécie-específica, utilizando os primers F.AL + F.As + R.both na mesma reação. Os primers F.AL e F.As foram desenhados para se anelar no DNA de *A. lumbricoides* e *A. suum*, respectivamente, enquanto o primer Rboth foi desenhado para se anelar no DNA de ambas as espécies (*A. lumbricoides*: F.AL + R.both = 374 pb; *A. suum*: F.As + R.both = 176 pb). Nas canaletas 1 e 2 foram utilizados controles positivos como template da reação (1: *A. lumbricoides*; 2: *A. suum*). Nas canaletas 03 a 27 foram aplicados produtos de PCR utilizando DNA genômico de ovo único. A canela 28 apresenta o “branco”. Todas as amostras analisadas corresponderam ao padrão de banda referente à espécie *A. lumbricoides*.

### 5.3 Genotipagem de ovos de *Ascaris* em amostras de fezes de suínos

Tendo em vista o resultado homogêneo das amostras de origem humana, sendo todas genotipadas como *A. lumbricoides* e como forma de comparação e validação da técnica, a presente técnica foi aplicada em amostras de DNA de ovos de *Ascaris* recuperados de fezes de suínos. Essas amostras são oriundas de duas propriedades localizadas na cidade de Sabará-

Minas Gerais onde foram coletadas amostras de fezes de 27 suínos. Destes, seis suínos testaram positivo, dos quais foram recuperados um total de 84 ovos de *Ascaris*.

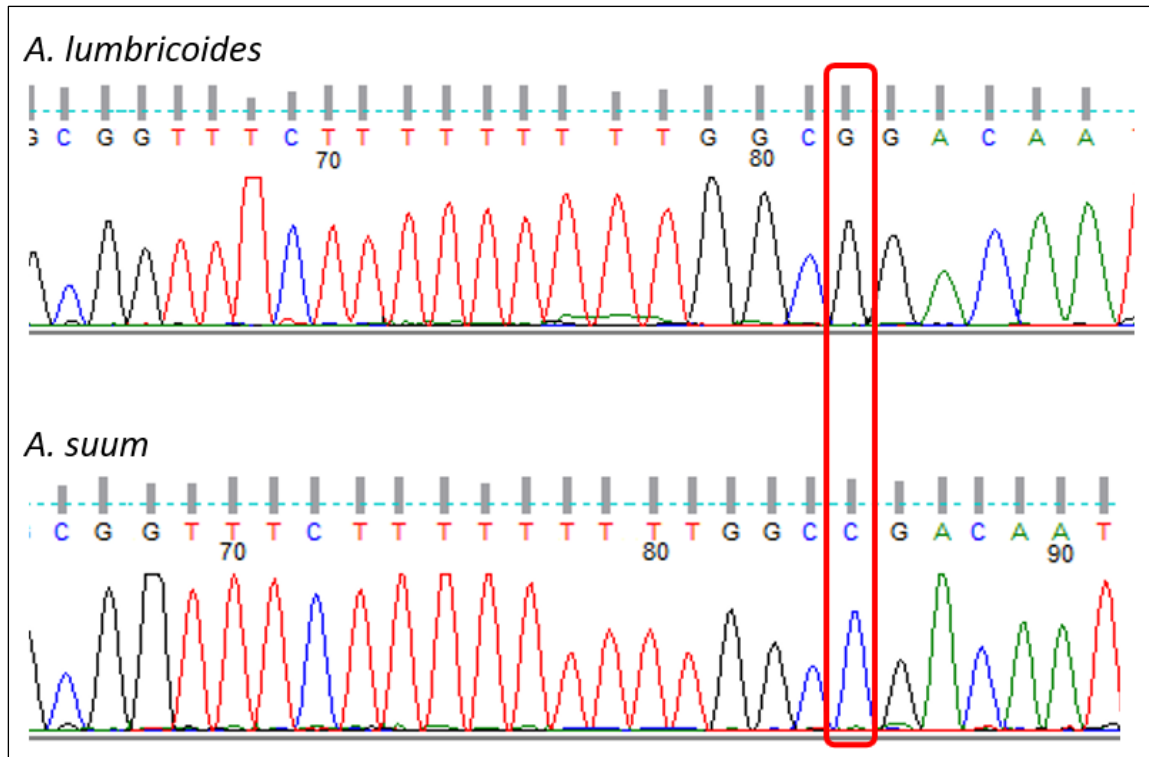
Dentre as amostras de ovos recuperados, o DNA de 71 ovos de *Ascaris* derivados de suínos foi amplificado. Quando vistas em gel de eletroforese, todas as amostras apresentaram o padrão de banda compatível com o controle positivo C.As, sendo portanto, identificados como ovos de *A. suum*. Os três helmintos adultos expelidos por um suíno foram genotipados e identificados como *A. suum*. Na Figura 6 é apresentado um gel representativo no qual consta o resultado da amplificação de 25 das 71 amostras de ovos de *Ascaris* recuperados de fezes de suínos.



**Figura 6** - Diferenciação molecular de ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum* de amostras de suínos. Eletroforese em gel de agarose 2% corado por gelred. PM: peso molecular. Nas canaletas de 1 a 28 foram aplicados produtos de PCR espécie-específica, utilizando os primers F.Al + F.As + R.both na mesma reação. Os primers F.Al e F.As foram desenhados para se anelar no DNA de *A. lumbricoides* e *A. suum*, respectivamente, enquanto o primer Rboth foi desenhado para se anelar no DNA de ambas as espécies (*A. lumbricoides*: F.Al + R.both = 374 pb; *A. suum*: F.As + R.both = 176 pb). Nas canaletas 1 e 2 foram utilizados controles positivos como template da reação (1: *A. lumbricoides*; 2: *A. suum*). Nas canaletas 03 a 27 foram aplicados produtos de PCR utilizando DNA genômico de ovo único. A canela 28 apresenta o “branco”. Todas as amostras analisadas corresponderam ao padrão de banda referente à espécie *A. suum*.

#### 5.4 Sequenciamento para validação da técnica

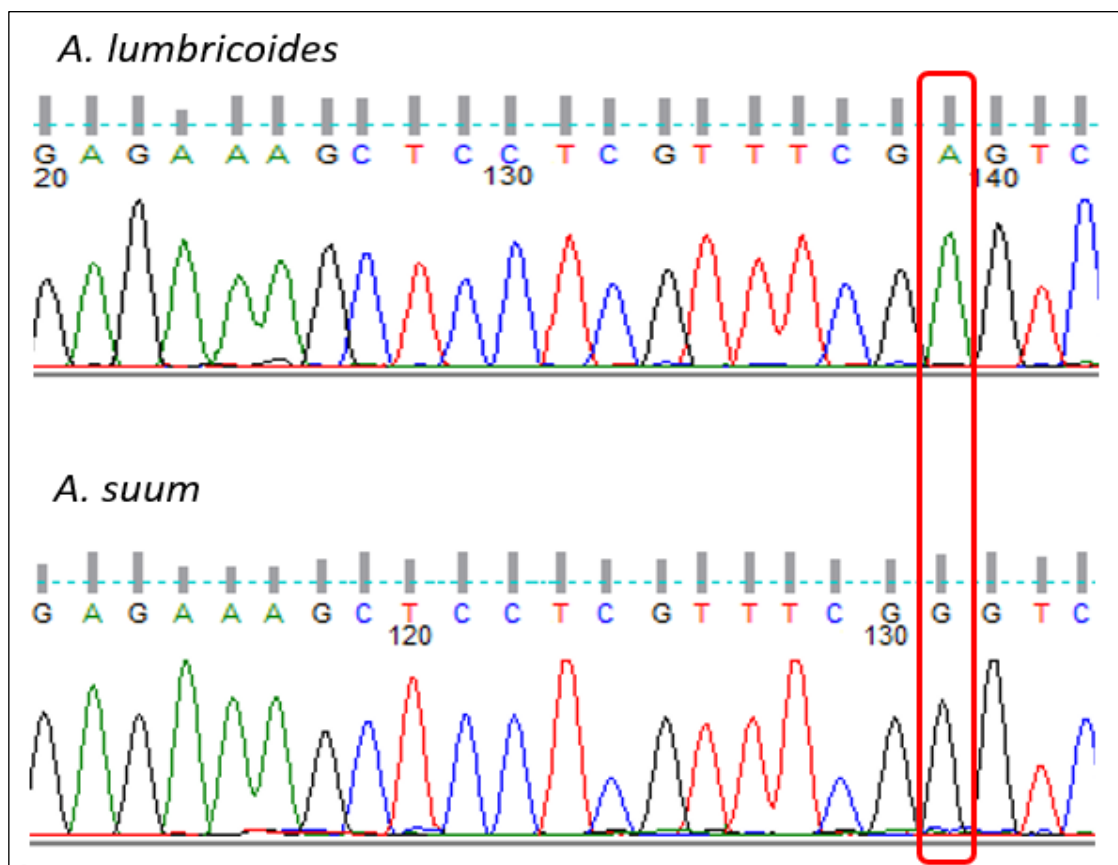
Foi realizado o sequenciamento da região ITS-1 do DNAr referente aos controles positivos sintetizados e para 25 amostras de DNA de ovo de *Ascaris* de humanos. Na Figura 7 é apresentado o cromatograma contendo o SNP presente na sequência de *A. lumbricoides* no qual, na posição nucleotídica 133 do alinhamento há uma guanina G (C→G), enquanto que na sequência de *A. suum* há uma C.



**Figura 7-** Cromatograma referente a região ITS-1 de *A. lumbricoides* e *A. suum* em que há o SNP (C→G) na posição 133. Em vermelho estão realçadas as trocas de bases nas sequências. Nas amostras genotipadas como *A. lumbricoides* pela técnica PCR espécie-específica, há uma G, enquanto que nas amostras identificadas como *A. suum* há uma C.

Na Figura 8 é realçado o SNP presente na sequência de *A. suum* no qual em uma posição específica do alinhamento há uma G (G→A) enquanto que na sequência de *A. lumbricoides* há uma A.





**Figura 8** - Cromatograma referente a região ITS-1 de *A. lumbricoides* e *A. suum* em que há o SNP (A→G) na posição 323. Em vermelho estão realçadas as trocas de bases nas sequências. Nas amostras genotipadas como *A. lumbricoides* pela técnica PCR espécie-específica, há uma A, enquanto que nas amostras identificadas como *A. suum* há uma G.

## 6 DISCUSSÃO

A ascaridíase humana trata-se de um sério problema econômico e de saúde pública nos países em desenvolvimento (Jordan et al., 2018). Deficiência de saneamento básico, práticas de higiene precárias e uma elevada parcela da população vivendo na pobreza, além de condições climáticas que favorecem o ciclo biológico do parasito, são fatores que contribuem para os elevados níveis de prevalência, sobretudo em crianças em idade escolar (Anuar et al., 2014; Pullan et al., 2014; Lai et al., 2019; Okoyo et al., 2020).

Todavia, têm ocorrido algumas mudanças consideráveis no quadro epidemiológico desta parasitose no mundo em virtude de dados crescentes de ascaridíase humana nos países desenvolvidos, onde outrora, os casos de infecção em humanos eram baixos ou inexistentes (Arizono et al., 2010; Avey et al., 2018). Quando descartada a infecção por residência ou viagens recentes a áreas endêmicas, a contaminação com o material fecal infectado de suínos tem sido apontada como a principal fonte de infecção. Esses relatos apontam fortemente para o potencial zoonótico de *A. suum* nessas regiões (Roepstorff et al., 2011; Miller et al., 2015; Taus et al., 2019).

No entanto, os métodos rotineiramente empregados para o diagnóstico não permitem uma identificação em nível de espécie devido à morfologia indistinguível dos ovos de *Ascaris*, sendo o resultado inferido com base na espécie hospedeira em análise e pela epidemiologia da região (Chaves et al., 2015; Korzeniewski, 2016; Inocencio da Luz et al., 2017). A identificação morfológica do helminto adulto é uma prática muito laboriosa, uma vez que se faz necessária à obtenção do espécime após a quimio-expulsão e análise por microscopia eletrônica das margens labiais (Leles et al., 2010; Sparks et al., 2015; Barbosa, 2015a; Monteiro et al., 2019).

Dada a presente conjuntura, neste trabalho foi proposta a padronização e aplicação de uma técnica molecular que possibilitasse a identificação das espécies de *Ascaris* a partir de DNA de ovo único. A metodologia de escolha foi a AS-PCR, amplamente empregada por permitir a identificação de mutações que podem ser úteis para o diagnóstico de doenças genéticas (Avanus e Altinel, 2017; Toye et al., 2018; Lefever et al., 2019), mas que ainda não fora utilizada para genotipagem de *Ascaris*.

Normalmente, a AS-PCR convencional consiste em submeter uma mesma amostra a duas reações separadas nas quais emprega-se o uso de primers que visam detectar o alelo mutado e não-mutado. Para o alelo mutado, o nucleotídeo 3' terminal do primer parecia-se com

o sítio da mutação buscada. O primer desenhado para o alelo não-mutado é refratário à sequência de DNA que contém o SNP, enquanto o primer desenhado para o alelo mutado é refratário à sequência de DNA sem o SNP (Toye et al., 2018). A sua variante, Bi-PASA (PCR Bidirecional com Amplificação de Alelos Específicos) consiste no uso de quatro primers, dois internos (alelo mutado e não-mutado) e dois primers externos, em uma mesma reação (Liu et al., 1997; Hashemi et al., 2012). Uma outra adaptação tem sido feita na técnica, a qual consiste no uso de três primers em uma mesma reação, sendo, geralmente, dois primers específicos (um para cada alelo) e um primer em comum (Bundock et al., 2006; Gaudet et al., 2009; Avanus e Altinel, 2017; Lefever et al., 2019).

Apesar da existência de uma incompatibilidade, uma única base nucleotídica divergente pode não ser o suficiente para impedir a amplificação inespecífica, portanto, autores sugerem a inserção de uma incompatibilidade adicional para aumentar a especificidade dos primers, além do uso da *Taq* DNA polimerase sem atividade exonuclease (Gaudet et al., 2009; Furtado e Rabelo, 2014; Lefever et al., 2019).

No caso do presente trabalho, três primers foram utilizados em uma mesma reação, sendo dois primers específicos (F.Al específico para *A. lumbricoides* e F.As específico para *A. suum*) e o primer reverse R.both, que anela-se a uma região comum a ambas. Concernente aos primers deve-se destacar que cada primer específico foi desenhado para anelar-se à região que contém o SNP, região esta diferente entre as espécies, ao contrário do que usualmente é feito. A vantagem consiste na geração de fragmentos de tamanhos diferentes quando vistos na eletroforese, permitindo a diferenciação das espécies. Determinou-se ainda a inserção da segunda incompatibilidade na posição -4 da extremidade 3' terminal, conforme Furtado e Rabelo (2014), para inibir o anelamento inespecífico.

Outra vantagem apresentada é o uso de DNA obtido a partir de ovo único das fezes dos hospedeiros, ao contrário de muitos estudos que utilizam DNA do helminto adulto (Arizono et al., 2010; Betson et al., 2014; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017; Palma et al., 2019). A obtenção de DNA a partir do helminto adulto é vantajosa pela maior quantidade de DNA gerado quando comparado ao DNA de ovo individual, no entanto, a obtenção do espécime adulto é mais trabalhosa para a prática clínica e incômoda para o paciente. Ademais, neste estudo, o DNA foi extraído de ovos contendo a L3, o que aumenta a quantidade de DNA obtido, ao contrário do seu uso em estágios iniciais (Carlsgart et al., 2009; Zuccherato et al.,

2018). Para uso como controles positivos e padronização das reações, foram sintetizados controles por meio de clonagem, o que reduz a necessidade de constantes extrações de DNA.

Conforme mencionado anteriormente, outras técnicas moleculares já têm sido empregadas para este fim, obtendo um considerável êxito na identificação das espécies (Anderson et al., 1993; Zhu et al., 1999; Peng et al., 2003; Nejsun et al., 2005; Leles et al., 2009; Dutto e Petrosillo, 2013; Betson et al., 2014; Sparks et al., 2015). Uma das técnicas mais empregadas nos estudos relacionados à *Ascaris* é a técnica RFLP-PCR, aplicada para a genotipagem das espécies, gerando dados muito informativos acerca da epidemiologia de *Ascaris* nas regiões estudadas (Anderson, 1995; Zhu et al., 1999; Nejsun et al., 2005; Dutto e Petrosillo, 2013; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017).

A principal característica dessa técnica é o uso de endonucleases de restrição após amplificação, sendo a enzima *HaeIII* a enzima de restrição mais utilizada nos estudos com *Ascaris*. A escolha justifica-se por haver um sítio polimórfico e outro homólogo entre as espécies, o sítio GGCC na região do espaço transcrito 1 do DNA que codifica para o RNA ribossomal. Essa região é polimórfica na sequência de *A. lumbricoides*, o que resulta na perda de um sítio de restrição, gerando dois fragmentos após a digestão, e em *A. suum* a digestão resulta em três fragmentos (Anderson, 1995; Zhu et al., 1999; Sparks et al., 2015; Arizono et al., 2010).

A técnica de RFLP-PCR baseia-se na detecção de um único SNP para diferenciar as espécies, não permitindo a detecção de SNPs diferentes que estejam presentes em outras regiões do DNA (Orita et al., 1989; Ota et al., 2007; Jesudoss-Chelladurai et al., 2017). O sítio polimórfico para a endonuclease *HaeIII* é usado como marcador para distinguir as duas espécies e possíveis híbridos, no entanto Anderson (1995) demonstrou que a frequência do sítio polimórfico é variável nas populações de *Ascaris* obtidos de humanos de diferentes regiões do mundo, o que pode representar uma fragilidade dessa metodologia em larga escala (Anderson, 2001). Neste contexto, uma vantagem de técnicas que visam a genotipagem de polimorfismos é a possibilidade da detecção de mutações pontuais que estejam presentes em qualquer região do genoma (desde que sejam desenhados primers para aquela região) e não apenas em locais de clivagem para as enzimas (Newton et al., 1989). Além disso, na RFLP-PCR a utilização de uma enzima de restrição, que nem sempre tem custo acessível, aliada à necessidade de submeter o produto amplificado a um período de digestão, consistem em desvantagem por aumentar o tempo de execução da técnica (Ye et al., 2001).

A técnica SSCP-PCR foi empregada nos trabalhos iniciais com *Ascaris*, partindo do pressuposto de que mudanças nucleotídicas únicas mudariam a conformação da molécula de ssDNA, alterando o padrão de migração em gel, o que permitiria a diferenciação das espécies (Peng et al., 2003; Peng et al., 2005). Contudo, além da geração de géis de difícil interpretação, a execução da técnica passa pela padronização de muitas variáveis que podem afetar a sua sensibilidade, como: o tipo de mutação buscada e tamanho do fragmento; conteúdo de G-C; tipo de matriz, temperatura e tamanho do gel e a composição e pH do tampão. Além de ser uma técnica que exige um maior tempo de execução (Kakavas et al., 2008).

A realização da PCR convencional seguida pelo sequenciamento tem sido muito aplicada em estudos mais recentes, especialmente por serem estudos que utilizam os dados do sequenciamento em análises que possibilitam a investigação das relações filogenéticas e epidemiologia de *Ascaris*. (Iñiguez et al., 2012; Betson et al., 2014; Sadaow et al., 2018; Zhou et al., 2018; Monteiro et al., 2019). Contudo, apesar das evidentes vantagens, o sequenciamento ainda é um processo relativamente caro e demorado para ser amplamente aplicado na prática clínica ou em estudos em maior escala (Delvaux et al., 2015).

A técnica RT-qPCR foi utilizada por Shao et al. (2014) para a caracterização dos perfis de miRNA entre as duas espécies. A técnica consiste em utilizar o primer *stem-loop* RT o qual hibidiza com a extremidade 3' terminal do miRNA seguida pela transcrição reversa do mesmo à cDNA (DNA complementar) por meio da enzima *reverse transcriptase*. Em seguida, é realizada a qPCR utilizando como molécula repórter o SYBR Green (Chen et al., 2005). Esta técnica é vantajosa por permitir a detecção em tempo real dos amplicons, não sendo necessário os processamentos pós-PCR. Porém, no trabalho de Shao et al. (2014), as reações de transcrição reversa e qPCR foram feitas separadamente, o que aumenta as chances de contaminação. Para a realização da qPCR o maquinário e reagentes são específicos e com valor elevado e há a necessidade de implementação de diferentes estratégias para reduzir o erro durante os múltiplos processos com o RNA, sendo limitantes para o emprego da técnica em algumas situações (Chen et al., 2005; Huggett e Bustin, 2011; Shao et al., 2014).

Por fim, uma Multiplex-PCR a partir de ovo único não embrionado de *Ascaris*. foi sugerida por Carlsgart et al. (2009). Os autores utilizaram dois conjuntos de primers que permitiram a amplificação dos alvos moleculares, ITS-1 e COX-1 utilizando DNA de ovo não embrionado em uma mesma reação. Com essa técnica, é possível a amplificação de dois locos

gênicos distintos e úteis para diferentes análises. Contudo, o alvo ITS-1 amplificado na Multiplex-PCR não permite a identificação em nível de espécie, sendo os dados de espécie obtidos após digestão com enzima *HaeIII*. A utilização de DNA de ovo não embrionado é aparentemente vantajosa por não ser necessário despende tempo com o embrionamento, apesar da quantidade de DNA ser consideravelmente reduzida (Carlsgart et al., 2009).

Após a padronização da técnica, no presente trabalho, foram genotipados DNA de ovo único de *Ascaris* obtidos de fezes de origem humana e suína. Todas as amostras de humanos foram genotipadas como *A. lumbricoides* e todas as amostras de origem suína foram genotipadas como *A. suum*. Algumas das amostras de suínos utilizadas neste trabalho foram coletadas em ambientes onde humanos e suínos conviviam em contato próximo, no entanto, as amostras de fezes de humanos desses locais foram negativas para *Ascaris* (dados não mostrados) e as amostras de suínos foram genotipadas como *A. suum*. Sugere-se que novos trabalhos sejam realizados, no intuito de tentar fazer uma possível correlação entre amostras positivas para *Ascaris* em suínos e amostras dos criadores de suínos, inclusive com aplicação de questionários que podem ajudar a traçar o nível de salubridade nessa relação suíno-humano.

Os resultados encontrados estão em concordância com a literatura vigente, a qual demonstra que, em regiões endêmicas para a ascaridíase humana e suína, os ciclos de transmissão são separados, mesmo em populações simpátricas, apesar de ser assumida a existência de um fluxo gênico limitado entre as espécies em algumas regiões, devido à detecção de infecção cruzada com consequente compartilhamento de haplótipos e encontro de híbridos, contudo em baixos níveis (Anderson et al., 1993; Peng et al., 2005; Criscione et al., 2007; Sparks et al., 2015). Barbosa (2015a) após analisar amostras de fezes de humanos provenientes de uma robusta amostragem, recuperaram *Ascaris* adultos nas fezes de três pacientes de Iguatama (MG) e após a realização de uma PCR convencional com a amplificação do alvo ITS-1, dois indivíduos foram diagnosticados com infecção por *A. lumbricoides* e um indivíduo diagnosticado com infecção por *A. suum*, sendo esta última amostra proveniente de um indivíduo que criava suínos no peridomicílio. Os amplicons resultantes apresentaram uma banda de 250 pb para *A. lumbricoides* e uma banda de 200 pb referente a *A. suum* e os autores não genotiparam os ovos de *Ascaris*. A reprodução da técnica padronizada por Barbosa (2015a) foi realizada pelo nosso grupo, porém, sem êxito. Variações genéticas entre as amostras provenientes de diferentes regiões do país podem ter implicado nos resultados, além de outros fatores inerentes a técnica. Todavia, há descrições de

haplótipos e genótipos dominantes em *Ascaris* advindos de um dado hospedeiro, revelando uma afiliação hospedeira em populações simpátricas de regiões endêmicas (Peng et al., 2003; Peng et al., 2005; Betson et al., 2014; Monteiro et al., 2019).

Em contraste, em regiões não endêmicas, usualmente são encontrados níveis elevados de infecção cruzada, sendo os humanos, infectados por *Ascaris* derivados de suínos e uma porcentagem elevada de híbridos também tem sido relatada, sendo a ascaridíase nessas regiões caracterizada como uma zoonose (Anderson, 1995; Nejsun et al., 2009; Betson et al., 2014). Os resultados do presente trabalho sugerem o perfil de transmissão visto em outros estudos, os quais demonstram que, em regiões endêmicas, os casos de infecção humana são resultantes da transmissão entre humano-humano (Anderson, 1993; Sadaow et al., 2018). Enquanto que na literatura há estudos demonstrando que em regiões não endêmicas as infecções geralmente são resultantes da transmissão suíno-humano (Nejsun et al., 2005; Arizono et al., 2010).

Todavia, o uso de diferentes marcadores moleculares em estudos epidemiológicos podem gerar resultados e conclusões divergentes, mesmo tendo sido aplicados nas mesmas amostras, como bem evidenciado por Sparks et al. (2015) que ao realizar a genotipagem de helmintos adultos oriundos do Zanzibar tendo como alvo a região ITS-1, detectaram um caso de infecção cruzada por *A. suum*, enquanto Betson et al. (2014), tendo como alvo loci de miscrossatélites, não detectaram casos infecção cruzada por *A. suum* ao analisar as mesmas amostras. Este conceito é especialmente importante em trabalhos que visam compreender a distribuição de haplótipos e a frequência de híbridos na população de *Ascaris* em uma dada região, pois análises com diferentes marcadores e diferentes metodologias de análises têm gerado diferentes resultados (Criscione et al., 2007; Betson et al., 2011; Monteiro et al., 2019).

O status taxonômico de *A. lumbricoides* e *A. suum* permanece incerto em virtude da considerável similaridade entre os caracteres utilizados para diferenciação entre as espécies, apesar dos avanços nas análises moleculares, trazendo a tona a longa discussão se estas não seriam uma mesma espécie (Zhu et al., 2000; Leles et al., 2012; Betson et al., 2016).

Zhu et al. (2000), ao analisar ITS-1 e ITS-2 do DNAr para auxiliar na taxonomia de 15 táxons de membros da Superfamília Ascaridoidea, verificaram que essas regiões mostraram-se úteis para diferenciação, pois foi detectada uma variação de 9,4 a 51,9% e de 11 a 66,6% nas sequências ITS-1 e ITS-2, respectivamente, entre as 13 espécies comparadas. Porém, ao

comparar as sequências nucleotídicas de *A. lumbricoides* e *A. suum*, foi vista uma diferença de 1,3% entre a região ITS-1, enquanto a região ITS-2 mostrou-se idêntica entre as espécies, como previamente mostrado por Zhu et al. (1999). As regiões ITS-1 e ITS-2 têm sido alvos de escolha para diferenciação espécie-específica de espécies conhecidas de nematódeos por serem o loci mais variáveis no DNAr e pela disponibilização de primers universais (Blouin, 2002). Contudo, para espécies intimamente relacionadas, tem sido recomendado o uso de marcadores do DNAmT por apresentar uma taxa de evolução maior quando comparado ao DNAr (Anderson et al., 1998; Blouin, 2002; Zhou et al., 2020b). Consequentemente, as análises moleculares tendo como alvo loci do DNAmT foram desenvolvidas, sendo o gene COX-1 e as subunidades do grupo NADH os marcadores mais utilizados (Peng et al., 2005; Betson et al., 2014; Monteiro et al., 2019). Esses trabalhos, usando um ou ambos os marcadores, comumente resultam na formação de três clusters, com uma tendência dos haplótipos ou espécie de *Ascaris* referentes a um dado hospedeiro agruparem-se em um determinado cluster, porém nota-se uma distribuição mais dispersa de alguns espécimes e haplótipos, podendo encontrar *Ascaris* de ambos os hospedeiros compartilhando o mesmo cluster, não sendo sempre seguro afirmar uma afiliação hospedeira ou geográfica em alguns casos (Anderson et al., 1993; Cavallero et al., 2013; Betson et al., 2014; Monteiro et al., 2019). A ausência na formação de clusters bem separados de acordo com a espécie e a discreta divergência nucleotídica, mesmo usando dois genes mitocondriais, revelam algumas limitações na aplicação desses genes como marcadores espécie-específicos (Iniguez et al., 2012; Monteiro et al., 2019).

Contudo, análises de lócus gênicos isolados podem não refletir a informação gênica de outros lócus mitocondriais (Nejsum et al., 2017) e o uso de diferentes loci podem gerar resultados conflitantes tendo em vista as diferentes taxas de evolução entre eles (Zhou et al., 2020b). Por conseguinte, análises filogenéticas foram desenvolvidas utilizando como marcadores 12 genes codificantes de proteínas e o gene COX-1 e os autores encontraram resultados semelhantes gerados pelos marcadores, não demonstrando uma clara segregação entre as espécies (Nejsum et al., 2017). No entanto, Zhou et al. (2020b) constataram um agrupamento das amostras chinesas em um cluster específico, mas o mesmo não ocorreu com as amostras de outras origens, não apoiando a hipótese de um isolamento geográfico antes das trocas de hospedeiros e as amostras de *Ascaris* híbridas agruparam-se em um cluster separado. Liu et al. (2012) analisando o genoma mitocondrial completo constataram uma baixa divergência nucleotídica como uma variação de 1,9% entre as espécies, variação esta



semelhante ao que foi visto entre indivíduos de uma mesma espécie para outros nematódeos (Blouin, 2002). O genoma mitocondrial pode sofrer alterações por hibridização e introgressão gênica (Liu et al., 2012), sendo recomendado por alguns autores a associação de outros marcadores como, loci de microssatélites às análises moleculares (Iniguez et al., 2012; Nejsun et al., 2017).

O uso de loci de microssatélites mostra-se interessante por revelar os padrões de infecção contemporâneos, demonstrando mudanças recentes no genoma nuclear, o qual apresenta uma taxa de evolução mais rápida que o DNAm (Molnar et al., 2012; Nejsun et al., 2017). Por meio deste marcador foi possível detectar os genótipos relacionados a *Ascaris* oriundos de humanos e suínos e de híbridos na China (Zhou et al., 2012). O uso de oito loci de microssatélites permitiu verificar uma clara segregação de *Ascaris* nos países em desenvolvimento de acordo com a origem hospedeira e a verificação de infecção zoonótica nos países desenvolvidos, porém não detectaram hibridização em nenhum dos países amostrados (Betson et al., 2014). Ao utilizar 28 loci de microssatélites, mesmo dispo de um número amostral menor, foi detectado 4% de híbridos na Guatemala e 7,8% na China, revelando as particularidades na dinâmica de infecção nas diferentes regiões e a possível necessidade de dispor de um número maior de loci de microssatélites (Criscione et al., 2007; Zhou et al., 2012; Betson et al., 2014).

Os dados apresentados acima levam a constatação do complexo cenário taxonômico da ascariíase o qual exerce um impacto direto no desenvolvimento de um diagnóstico espécie-específico, sendo, em muitos casos, inviável a aplicação de diferentes marcadores moleculares e análises de genômica e sequenciamento para a realização de um diagnóstico.

Portanto, definiu-se a região ITS-1 como alvo molecular de escolha para este trabalho por ser uma região de múltiplas cópias e por possuir SNPs bem caracterizados entre as duas espécies, sendo que na posição nucleotídica 133 há uma Guanina na sequência de *A. lumbricoides* e uma Citosina na sequência de *A. suum*; na posição 246 há uma Timina na sequência de *A. lumbricoides* e uma Adenina na sequência de *A. suum*; enquanto na posição 323 há uma Adenina em *A. lumbricoides* e uma Guanina em *A. suum* (Blouin, 2002; Arizono et al., 2010; Sadaow et al., 2018).

Sabe-se que algumas limitações têm sido reportadas ao utilizar este marcador, como a detecção de mais de um genótipo/haplótipo em uma mesma amostra de DNA de ovo, demonstrando uma variação intraindividual (Leles et al., 2010). Esta variabilidade justifica-se

por ser o ITS-1 uma região de múltiplas cópias, sendo que, em *Ascaris* há aproximadamente 42 cópias, possibilitando que haja o encontro de mais de uma sequência do ITS-1 em um mesmo ovo (Pecson et al., 2006). Todavia, essa variabilidade é notada apenas em amostras que foram clonadas e suas sequências analisadas. Sem a clonagem é possível detectar apenas uma cópia do ITS-1, cópia esta mais abundante no genoma (Pecson et al., 2006; Leles et al., 2010). Para o presente trabalho, que teve como finalidade o diagnóstico diferencial das espécies e não análises aprofundadas de bioinformática, a possibilidade de variabilidade intraindividual não interfere diretamente nos resultados, pois a sequência ITS-1 mais abundante poderá ser identificada pelos primers.

Contudo, o encontro de mais de um genótipo para a sequência ITS-1 em uma mesma amostra, pode ocorrer, sendo um indicativo de hibridização, conforme detectado em outros trabalhos (Anderson, 1995; Dutto e Petrosillo, 2013; Sadaow et al., 2018). Nesse trabalho, foi mimetizado um híbrido com a mistura dos controles positivos de *A. lumbricoides* e *A. suum* e os primers foram capazes de produzir amplicons referentes a cada espécie, porém dentre as amostras analisadas, híbridos não foram detectados.

Outra limitação apontada ao uso do ITS é a elevada similaridade entre as espécies, sendo ITS-2 idêntico entre as espécies e ITS-1 possui apenas 1,3 % de divergência entre as espécies (Zhu et al., 1999; Sadaow et al., 2018; Palma et al., 2019). Apesar de ser uma diferença menor do que já fora visto entre as sequências ITS de indivíduos de uma mesma espécie para outros parasitos (Zhu et al., 2000), são diferenças que têm sido identificadas em trabalhos realizados com *Ascaris* de diferentes regiões, demonstrando que possivelmente não trata-se de meras variações nucleotídicas de uma mesma população, mas de diferenças fixas e que são úteis para a diferenciação das espécies (Jesudoss-Chelladurai et al., 2017; Sadaow et al., 2018).

Por conseguinte, apesar de suas limitações, o ITS-1 permanece por ser um marcador informativo para a diferenciação das espécies (Arizono et al., 2010; Zhou et al., 2012), sendo utilizado nos diferentes trabalhos também como um passo prévio para verificar a identidade individual das espécies antes de prosseguir com as análises com outros marcadores. Isso é um resultado, mesmo que indireto, da eficiência do uso deste marcador para fins de diagnóstico diferencial rápido (Carlsgart et al., 2009; Liu et al., 2012; Snábel et al., 2012; Zhou et al., 2012; Shao et al., 2014; Sadaow et al., 2018).

Os resultados das amostras analisadas neste trabalho demonstraram um padrão de transmissão bem separado entre as espécies, todavia, análises de outros grupos, utilizando marcadores do DNAm e microssátelites detectaram o compartilhamento de haplótipos e genótipos entre humanos e suínos na população brasileira, sendo um indicativo de que a infecção cruzada está ocorrendo em algumas regiões (Leles et al., 2009; Iñiguez et al., 2012; Monteiro et al., 2019). Deve-se salientar que, o presente trabalho não objetivou realizar uma análise epidemiológica molecular de *Ascaris* nas regiões amostradas, pois para tal fim, seriam necessários a obtenção de dados mais aprofundados acerca dos pacientes, além do uso de mais de um marcador molecular para aumentar a confiabilidade dos resultados.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a técnica PCR espécie-específica, aqui proposta, para a diferenciação das espécies de *Ascaris* a partir de DNA de ovo é sensível, específica e de fácil aplicação. Portanto, tendo em vista essas características, é possível a sua aplicação na prática clínica e em levantamentos epidemiológico-moleculares de áreas endêmicas, auxiliando na implementação de estratégias de controle da ascaridíase. Os resultados obtidos podem ser facilmente interpretados na eletroforese em gel de agarose, ao comparar as amostras com os controles positivos clonados.

As variações gradativas que têm sido vistas no perfil epidemiológico da ascaridíase nas diferentes regiões, têm implicações diretas nas medidas de controle, pois ao assumir a possibilidade de infecção cruzada e sendo reconhecido o potencial zoonótico de *A. suum*, conclui-se que os suínos precisam ser abrangidos pelas medidas de controle e profilaxia, trazendo à tona o conceito de *One Health*, que trata da integração entre a saúde humana, animal e do meio ambiente, com adoção de políticas públicas efetivas para prevenção e controle de enfermidades. Além dos suínos infectados atuarem como fontes de infecção para os humanos, os híbridos resultantes da co-infecção podem carrear genes relacionados à resistência a medicamentos ou reduzir a especificidade hospedeira, gerando novos desafios no contexto da ascaridíase.

O real cenário epidemiológico de *Ascaris* é subestimado, tendo em vista a aplicação de técnicas que não permitem um diagnóstico espécie-específico, principalmente nos países em desenvolvimento. Portanto, a aplicação de metodologias moleculares que possibilitam um diagnóstico em nível de espécie é imprescindível para a compreensão da real epidemiologia da ascaridíase no mundo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA SOTO L, SANTÍSIMA-TRINIDAD AB, BORNAY-LLINARES FJ, et al. Quantitative PCR and Digital PCR for Detection of *Ascaris lumbricoides* Eggs in Reclaimed Water. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7515409.

D'ALENCAR AS, FAUSTINO MAG, SOUSA DP, et al. Infecção por helmintos e coccídios em criação de suínos de sistema confinado localizada no município de Camaragibe, PE. *Ciênc. Vet. Tróp.* 2006. 9:19-86.

ALVES EB DA S, CONCEIÇÃO MJ, LELES D. *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* or *Ascaris lumbricoides*? *J Infect Dis.* 2016; jiw027.

ANDERSON, T., ROMERO-ABAL, M., & JAENIKE, J. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: Patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology*, 1993; 107(3), 319-334.

ANDERSON TJ. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology.* 1995;110 ( Pt 2):215-219.

ANDERSON TJ, BLOUIN MS, BEECH RN. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv Parasitol.* 1998;41:219-83.

ANDERSON TJ. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol.* 2001;17(4):183-188.

ANSEL M. and THIBAUT M. Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linne´ 1758 and *Ascaris suum* Goeze 1782. *Int J Parasitol.* 1973; 3(3):317–19.

ANTUNES R C, CARRAZZA L G, SANT'ANA D S et al. Prevalência de parasitos gastrintestinais em leitões de terminação relacionada com densidade de alojamento e sexo. *PUBVET*, 2011, Londrina, V. 5, N. 5, Ed. 152, Art. 1020.

ANUAR T, SALLEH F, MOKTAR N. Soil-Transmitted Helminth Infections and Associated Risk Factors in Three Orang Asli Tribes in Peninsular Malaysia. *Scientific Reports* 2014;4, 4101.

DE ARAÚJO HG, DA SILVA JT, ÁLVARES FBV, et al. Prevalence and risk factors associated with swine gastrointestinal nematodes and coccidia in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2020;52(1):379-385

ARIZONO N, YOSHIMURA Y, TOHZAKA N, et al. Ascariasis in Japan: is pig-derived *Ascaris* infecting humans? *Jpn J Infect Dis* 2010; 63: 447-448.

AVANUS K, ALTINEL A. Comparison of allele-specific PCR, created restriction-site PCR, and PCR with primer-introduced restriction analysis methods used for screening complex vertebral malformation carriers in Holstein cattle. *J Vet Sci.* 2017;18(4):465-470.

AVERY RH, WALL LA, VERHOEVE VI, et al. Molecular Confirmation of *Ascaris suum*: Further Investigation into the Zoonotic Origin of Infection in an 8-Year-Old Boy with Loeffler Syndrome. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018;18(11):638-640.

- BARBOSA<sup>a</sup>, FS. Potencial zoonótico da ascaridiose humana e suína: aspectos moleculares, morfológicos e filogenéticos das espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*. Tese (Doutorado em Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015.
- BARBOSA<sup>b</sup> A S, BASTOS O M P, DIB L V, et al. Gastrointestinal parasites of swine raised in different management systems in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2015; 35(12), 941-946.
- BARRETT J. Studies on the induction of permeability in *Ascaris lumbricoides* eggs. *Parasitology*. 1976 ;73(1):109-21.
- BANGRATZ M, WONNI I, KINI K, et al. Design of a new multiplex PCR assay for rice pathogenic bacteria detection and its application to infer disease incidence and detect co-infection in rice fields in Burkina Faso. *PLoS One*. 2020;15(4):e0232115.
- BETHONY J, BROOKER S, ALBONICO M, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*.2006: 1521-1532.
- BETSON M, HALSTEAD FD, NEJSUM P, et al. A molecular epidemiological investigation of *Ascaris* on Unguja, Zanzibar using isoenzyme analysis, DNA barcoding and microsatellite DNA profiling. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(7):370-379.
- BETSON M, NEJSUM P, BENDALL RP, et al. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *J Infect Dis*. 2014;210(6):932-941.
- BLOUIN MS, YOWELL CA, COURTNEY CH, et al. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol Biol Evol*. 1998;15(12):1719-1727.
- BLOUIN, MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int. J. Parasitol*. 2002;32, 527–531.
- BLOUIN B, CASAPIA M, JOSEPH L, et al. A longitudinal cohort study of soil-transmitted helminth infections during the second year of life and associations with reduced long-term cognitive and verbal abilities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(7):e0006688.
- BROOKER S, BEASLEY M, NDINAROMTAN M, et al. Use of remote sensing and a geographical information system in a national helminth control programme in Chad. *Bull World Health Organ*. 2002;80(10):783-789.
- BROOKER S, CLEMENTS ACA, BUNDY DAP. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv Parasitol*. 2006;62:221–61.
- BOUTIN-GANACHE I, RAPOSO M, RAYMOND M, et al. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 2001 31: 24-26.
- BUNDOCK PC, CROSS MJ, SHAPTER FM et al. Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences. *Theor Appl Genet*. 2006;112(2):358-365.

- CARLSGART, J., ROEPSTORFF, A. & NEJSUM, P. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. *Parasitol Res.* 2009; 104, 939.
- CAVALLERO S, SNABEL V, PACELLA F, et al. Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2170.
- CHAVES LA, GONÇALVES AL, PAULA FM, et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for evaluation of fecal samples of immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology.* 2015;142(14):1715-1721.
- CHEEMA HA, WAHEED N, SAEED A. Rare presentation of haemobilia and Loeffler's pneumonia in a child by *ascaris lumbricoides*. *BMJ Case Rep.* 2019 28;12(8):e230198.
- CHEN C, RIDZON D A, BROOMER A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e179.
- CRISCIONE <sup>a</sup> CD, ANDERSON JD, RABY K, et al. Microsatellite markers for the human nematode parasite *Ascaris lumbricoides*: development and assessment of utility. *J Parasitol.* 2007;93(3):704-708.
- CRISCIONE <sup>b</sup> CD, ANDERSON JD, SUDIMACK D, et al. Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc Biol Sci.* 2007 7;274(1626):2669-77.
- CROMPTON DW, NESHEIM MC. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:35-59.
- DE LUCA F, REYES A, GRUNDER J et al. Characterization and Sequence Variation in the rDNA Region of Six Nematode Species of the Genus *Longidorus* (Nematoda). *J Nematol.* 2004;36(2):147-152.
- DE SILVA NR, BROOKER S, HOTEZ PJ. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol.* 2003;19:547–551.
- DIAWARA A, HALPENNY CM, CHURCHER TS, et al. Association between response to albendazole treatment and  $\beta$ -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 May 30;7(5):e2247.
- DELVAUX N, DA COSTA VD, DA COSTA MM, et al. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods.* 2015;220:1-4.
- DOLD C, HOLLAND CV. *Ascaris* and ascariasis. *Microbes Infect.* 2011;13(7):632-637.
- DUTTO M, PETROSILLO N. Hybrid *Ascaris suum/lumbricoides* (ascarididae) infestation in a pig farmer: a rare case of zoonotic ascariasis. *Cent Eur J Public Health.* 2013;21(4):224-226.

- EASTON AV, OLIVEIRA RG, WALKER M, et al. Sources of variability in the measurement of *Ascaris lumbricoides* infection intensity by Kato-Katz and qPCR. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):256.
- EIJCK IA, BORGSTEEDE FH. A survey of gastrointestinal pig parasites on free-range, organic and conventional pig farms in The Netherlands. *Vet Res Commun*. 2005;29(5):407-414..
- ELDER JF JR, TURNER BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol*. 1995;70(3):297-320.
- FAUSTO MC, OLIVEIRA IDE C, FAUSTO GC, et al. *Ascaris suum* in pigs of the Zona da Mata, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2015;24(3):375-378.
- FURTADO LF, RABELO EM. Development of a new amplification refractory mutation system for detection of a single nucleotide polymorphism linked to drug resistance in *Ancylostoma caninum*. *Genet Mol Res* 2015;14(2):5103-5111.
- FURTADO LFV, MEDEIROS CDS, ZUCCHERATO LW, et al. First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. *PLoS One*. 2019;14(10):e0224108. .
- GAN RW, GOHIL R, BELFIELD K, et al. Acute airway obstruction by *Ascaris lumbricoides* in a 14-month-old boy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014;78(10):1795-1798.
- GASBARRE LC. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Vet Parasitol*. 2014 30;204(1-2):3-11.
- GAUDET M, FARA AG, BERITOGNOLO I et al. Allele-specific PCR in SNP genotyping. *Methods Mol Biol*. 2009;578:415-24.
- HASHEMI M, ESKANDARI-NASAB E, FAZAELI A, et al. Bi-directional PCR allele-specific amplification (bi-PASA) for detection of caspase-8 -652 6N ins/del promoter polymorphism (rs3834129) in breast cancer. *Gene*. 2012;505(1):176-179.
- HAYWARD AC, TOLLENAERE R, DALTON-MORGAN J, et al. Molecular marker applications in plants. *Methods Mol Biol*. 2015;1245:13-27.
- HUGGETT, J. AND BUSTIN, S.A. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. *Accredit Qual Assur* 2011; 399-405.
- IÑIGUEZ AM, LELES D, JAEGER LH et al. Amazonas Research Group. Genetic characterisation and molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from humans and pigs in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(10):604-612.
- INOCENCIO DA LUZ R, LINSUKE S, LUTUMBA P et al. Assessment of schistosomiasis and soil-transmitted helminths prevalence in school-aged children and opportunities for integration of control in local health services in Kwilu Province, the Democratic Republic of the Congo. *Trop Med Int Health*. 2017;22(11):1442-1450.



- JARDIM-BOTELHO A, RAFF S, RODRIGUES R A, et al. Hookworm, *Ascaris lumbricoides* infection and polyparasitism associated with poor cognitive performance in Brazilian schoolchildren. *Trop Med Int Health*. 2008;13(8):994-1004.
- JESUDOSS-CHELLADURAI J, MURPHY K, SNOBL T, et al. Molecular Epidemiology of *Ascaris* Infection Among Pigs in Iowa. *J Infect Dis*. 2017;215(1):131-138.
- JOURDAN PM, LAMBERTON PHL, FENWICK A. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 2018;391, p.252–265.
- KARSHIMA SN. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth infections in Nigerian children: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Disease Poverty*. 2018;7(1):69.
- KATAKAM KK, MEJER H, DALSGAARD A, et al. Survival of *Ascaris suum* and *Ascaridia galli* eggs in liquid manure at different ammonia concentrations and temperatures. *Vet Parasitol*. 2014;204(3-4):249-57.
- KATAKAM KK, THAMSBORG SM, DALSGAARD A et al. Environmental contamination and transmission of *Ascaris suum* in Danish organic pig farms. *Parasit Vectors*. 2016;9:80.
- KAKAVAS VK, PLAGERAS P, VLACHOS TA, et al. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol Biotechnol*. 2008;38(2):155-163.
- KIM MK, PYO KH, HWANG YS, et al. Effect of temperature on embryonation of *Ascaris suum* eggs in an environmental chamber. *Korean J Parasitol*. 2012;50(3):239-242.
- KORZENIEWSKI K. Prevalence of intestinal parasitic infections in the population of Central Asia on the example of inhabitants of Eastern Afghanistan. *Przegl Epidemiol*. 2016;70(4):563-573.
- LAI YS, BIEDERMANN P, SHRESTHA A, et al. Risk profiling of soil-transmitted helminth infection and estimated number of infected people in South Asia: A systematic review and Bayesian geostatistical Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8):e0007580.
- LAKE SL, MATTHEWS JB, KAPLAN RM et al. Determination of genomic DNA sequences for beta-tubulin isotype 1 from multiple species of cyathostomin and detection of resistance alleles in third-stage larvae from horses with naturally acquired infections. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 2:S6.
- LEFEVER S, RIHANI A, VAN DER MEULEN J, et al. Cost-effective and robust genotyping using double-mismatch allele-specific quantitative PCR. *Sci Rep*. 2019;9(1):2150.
- LELES D, ARAÚJO A, FERREIRA LF, et al. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008 103(1), 106-108.
- LELES D, ARAÚJO A, VICENTE AC et al. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;163(1-2):167-170.

- LELES D, ARAÚJO A, VICENTE AC et al. ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil. *Parasitol Int.* 2010;59(1):93-6.
- LELES D, GARDNER SL, REINHARD K, et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasit Vectors.* 2012;5:42.
- LIU Q, THORLAND EC, HEIT JA, et al. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res.* 1997 ;7(4):389-98.
- LIU GH, WU CY, SONG HQ, et al. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene.* 2012;492(1):110-116.
- LOREILLE O, ROUMAT E, VERNEAU O, et al. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol.* 2001;31(10):1101-1106.
- MAHMOOD SA, LEE EY. Intestinal *Ascaris lumbricoides*. *Pediatr Radiol.* 2010;40(8):1452.
- MBANGA CM, OMBAKU KS, FAI KN et al. Small bowel obstruction complicating an *Ascaris lumbricoides* infestation in a 4-year-old male: a case report. *J Med Case Rep.* 2019;13(1):155.
- MEJER H, ROEPSTORFF A. Long-term survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs in relation to pasture management. In: Proceedings of the 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 2011. p. 113.
- MILLER LA, COLBY K, MANNING SE, et al. Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010–2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(2):332–4.
- MIR, L et al. *Genômica*. São Paulo; Editora Atheneu, 2004.
- MOLNAR RI, WITTE H, DINKELACKER I et al. Tandem-repeat patterns and mutation rates in microsatellites of the nematode model organism *Pristionchus pacificus*. *G3 (Bethesda)*. 2012;2(9):1027-1034
- MONTEIRO KJL, CALEGAR DA, SANTOS JP, et al. Genetic diversity of *Ascaris* spp. infecting humans and pigs in distinct Brazilian regions, as revealed by mitochondrial DNA. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218867.
- NEJSUM P, PARKER ED JR, FRYDENBERG J, et al. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol.* 2005 ;43(3):1142-8.
- NEJSUM P, ROEPSTORFF A, JØRGENSEN CB, et al. High heritability for *Ascaris* and *Trichuris* infection levels in pigs. *Heredity (Edinb)*. 2009 ;102(4):357-64.
- NEJSUM P, HAWASH MB, BETSON M, et al. *Ascaris* phylogeny based on multiple whole mtDNA genomes. *Infect Genet Evol.* 2017 ;48:4-9.

- NEWTON CR, GRAHAM A, HEPTINSTALL LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989 11;17(7):2503-16.
- NISSEN S, POULSEN IH, NEJSUM P, et al. Prevalence of gastrointestinal nematodes in growing pigs in Kabale District in Uganda. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43(3):567-572.
- OH C S, SEO M, HONG J H, et al. Ancient mitochondrial DNA analyses of *Ascaris* eggs discovered in coprolites from Joseon tomb. *Korean J Parasitol.* 2015 ;53(2):237-42.
- OLIVEIRA WJ, MAGALHÃES FDC, ELIAS AMS, et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(2):e0006232.
- OKOYO C, CAMPBELL SJ, WILLIAMS K, et al. Prevalence, intensity and associated risk factors of soil-transmitted helminth and schistosome infections in Kenya: Impact assessment after five rounds of mass drug administration in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(10):e0008604.
- ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 ;86(8):2766-70.
- OTA M, FUKUSHIMA H, KULSKI JK, et al. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2857-64.
- PALMA A, ORTIZ B, MENDOZA L, et al. Molecular analysis of human- and pig-derived *Ascaris* in Honduras. *J Helminthol.* 2019 ;93(2):154-158.
- PALMA A, MATAMOROS G, ESCOBAR D, et al. Absence of mutations associated with resistance to benzimidazole in the beta-tubulin gene of *Ascaris suum*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2020, 53, e20190155.
- PALOMARES-RIUS JE, CANTALAPIEDRA-NAVARRETE C, ARCHIDONA-YUSTE A et al. The utility of mtDNA and rDNA for barcoding and phylogeny of plant-parasitic nematodes from Longidoridae (Nematoda, Enoplea). *Sci Rep.* 2017;7(1):10905.
- PECSON BM, BARRIOS JA, JOHNSON DR, et al. A real-time PCR method for quantifying viable *Ascaris* eggs using the first internally transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol.* 2006 ;72(12):7864-72.
- PENG W, YUAN K, ZHOU X, et al. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Electrophoresis.* 2003; 24(14):2308-15.
- PENG W, YUAN K, HU M, et al. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. *Electrophoresis.* 2005 ;26(22):4317-26.

- PENG W, CRISCIONE CD. Ascariasis in people and pigs: new inferences from DNA analysis of worm populations. *Infect Genet Evol.* 2012 ;12(2):227-35.
- PLAYFORD MC, SMITH AN, LOVE S, et al. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009-2012). *Aust Vet J.* 2014;92(12):464-71.
- PINELLI E, HERREMANS T, HARMS MG, et al. *Toxocara* and *Ascaris* seropositivity among patients suspected of visceral and ocular larva migrans in the Netherlands: trends from 1998 to 2009. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(7):873-879.
- PINTO J M S, COSTA J O, SOUZA, J C A. Ocorrência de endoparasites em suínos criados em Itabuna, Bahia, Brasil, Ciência Veterinária nos Trópicos. 2007 v. 10, n. 2, p. 79–8.
- POURZAND C, CERUTTI P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutat Res.* 1993;288(1):113-21.
- PULLAN RL, SMITH JL, JASRASARIA R, et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors.* 2014;7:37.
- RITCHIE LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Dep.* 1948;8:326.
- ROEPSTORFF A, MURRELL KD. Transmission dynamics of helminth parasites of pigs on continuous pasture: *Ascaris suum* and *Trichuris suis*. *Int J Parasitol.* 1997 ;27(5):563-72.
- ROEPSTORFF A, NILSSON O, OKSANEN A, et al. Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. *Veterinary Parasitology* 1998; 76(4), 305–319.
- ROEPSTORFF A, MEJER H, NEJSUM P, et al. Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. *Vet Parasitol.* 2011;180(1-2):72-81.
- SADAOW L, SANPOOL O, PHOSUK I, et al. Molecular identification of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* recovered from humans and pigs in Thailand, Lao PDR, and Myanmar. *Parasitol Res.* 2018;117(8):2427-2436.
- SHAO CC, XU MJ, ALASAAD S, et al. Comparative analysis of microRNA profiles between adult *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *BMC Vet Res.* 2014;10:99.
- SEAMSTER AP. Developmental studies concerning the eggs of *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. *The American Midland Naturalist.* 1950;43:450-68.
- SNÁBEL V, TAIRA K, CAVALLERO S, et al. Genetic structure of *Ascaris* roundworm in Japan and patterns of its geographical variation. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(2):179-83.
- SØE MJ, KAPEL CM, NEJSUM P. *Ascaris* from Humans and Pigs Appear to Be Reproductively Isolated Species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004855.
- SPARKS AM, BETSON M, OVIEDO G et al. Characterization of ascaris from ecuador and zanzibar. *J Helminthol.* 2015;89(4):512-515.

STEWART TB, HALE OM. Losses to internal parasites in swine production [published correction appears in J Anim Sci 1988 ;66(10):2711]. J Anim Sci. 1988;66(6):1548-1554.

SUNNUCKS P. Efficient genetic markers for population biology. Trends Ecol Evol. 2000; 15(5):199-203.

TAUS K, SCHMOLL F, EL-KHATIB Z, et al. Occupational swine exposure and Hepatitis E virus, *Leptospira*, *Ascaris suum* seropositivity and MRSA colonization in Austrian veterinarians, 2017-2018-A cross-sectional study. Zoonoses Public Health. 2019;66(7):842-851.

TAKATA I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. Kitasato Arch Exp Med. 1951;23(4):151-59.

THAMSBORG SM, NEJSUM P, MEJER H. Impact of *Ascaris suum* in livestock. In: Holland C, ed. *Ascaris* the neglected parasite. London: Academic Press, 2013.

TOYE ET, V MARLE G, HUTCHINS W et al. Single tube allele specific PCR: a low cost technique for molecular screening of sickle cell anaemia in Nigeria. Afr Health Sci. 2018;18(4):995-1002.

UMETSU S, SOGO T, IWASAWA K, et al. Intestinal ascariasis at pediatric emergency room in a developed country. World J Gastroenterol. 2014;20(38):14058-14062.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis. Geneva: World Health Organization, 2004.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. WHO. 2010.

YE S, DHILLON S, KE X et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res. 2001;29(17):E88-e88.

ZHANG H, MORRISON S, TANG YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. Clin Lab Med. 2015 ;35(2):461-86.

ZHAO J, WILLIAMS AR, HANSEN TVA, et al. An in vitro larval migration assay for assessing anthelmintic activity of different drug classes against *Ascaris suum*. Vet Parasitol. 2017 30;238:43-48.

ZHOU C, LI M, YUAN K et al. Pig *Ascaris*: an important source of human ascariasis in China. Infect Genet Evol. 2012;12(6):1172-1177.

ZHOU C, JIAN S, PENG W et al. Genetic Diversity of *Ascaris* in China Assessed Using Simple Sequence Repeat Markers. Korean J Parasitol. 2018;56(2):175-181.

ZHOU<sup>a</sup> C, CHEN J, NIU H, et al. Study on the population evolution of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* based on whole genome resequencing. Vet Parasitol. 2020 ;279:109062



ZHOU<sup>b</sup> C, GUO T, DENG Y, et al. Mitochondrial phylogenomics of human-type *Ascaris*, pig-type *Ascaris*, and hybrid *Ascaris* populations. Vet Parasitol. 2020 ; 30;287:109256.

ZHU, X., CHILTON, N.B., JACOBS, D.E. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 1999;29, 469–478.

ZHU X, GASSER R B, JACOBS D E et al. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res.* 2000 ;86(9):738-44.

ZUCCHERATO LW, FURTADO LF, MEDEIROS CDS, et al. PCR-RFLP screening of polymorphisms associated with benzimidazole resistance in *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* from different geographical regions in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 17;12(9):e0006766.

## ANEXO A - Produção Resultante da Dissertação

	28/10/2020 870200136013 16:45  29409161922461686
<b>Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT</b>	
Número do Processo: BR 10 2020 022093 4	
<b>Dados do Depositante (71)</b>	
Depositante 1 de 1	
Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica	
CPF/CNPJ: 17217985000104	
Nacionalidade: Brasileira	
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa	
Endereço: Av. Antônio Carlos, 8627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011	
Cidade: Belo Horizonte	
Estado: MG	
CEP: 31270-901	
País: Brasil	
Telefone: (31) 3409-6430	
Fax:	
Email: patentes@ctit.ufmg.br	
<b>Dados do Pedido</b>	
Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)	
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): INICIADORES PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DIFERENCIAL DE ASCARIS LUMBRICOIDES E ASCARIS SUUM, KIT, MÉTODO E USOS	
Resumo: A presente tecnologia trata de iniciadores, um kit contendo os mesmos e método para o diagnóstico molecular diferencial das espécies de helmintos Ascaris lumbricoides e Ascaris suum, espécies que infectam humanos e suínos, respectivamente.	
Figura a publicar: 2	

Nome: TALITA RODRIGUES DOS SANTOS

CPF: 13224629681

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

#### Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	1 - Comprovante de pagamento GRU - 29409161922461686-mesclado.pdf
Portaria	2 - Portaria 2195-2020 - Prof. Gilberto UFMG.pdf
Relatório Descritivo	3 - Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	4 - Reivindicações.pdf
Desenho	5 - Desenhos.pdf
Resumo	6 - Resumo.pdf

#### Sequências Biológicas

---

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Listagem de Seq NI 39-2020 Untitled_ST25.txt



## ANEXO B - Produção Resultante de Colaboração

Infection, Genetics and Evolution 86 (2020) 104594

Contents lists available at ScienceDirect

**Infection, Genetics and Evolution**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

Research Paper

**Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y in the beta-tubulin gene of *Necator americanus* helminths obtained from Brazilian populations**

Luis Fernando Viana Furtado<sup>a</sup>, **Talita Rodrigues dos Santos<sup>b</sup>**,  
Valéria Nayara Gomes Mendes de Oliveira<sup>b</sup>, Éliada Mara Leite Rabelo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais, Avenida Juca Stockler, 1130, CEP 37900-106, Nossa Sra. das Graças, Passos, Minas Gerais, Brazil  
<sup>b</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Departamento de Parasitologia, L4 237, Laboratório de Parasitologia Molecular, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
*Necator americanus*  
Beta-tubulin  
Drug resistance  
ARMS-PCR

**ABSTRACT**

*Necator americanus* is a worm that parasites the small intestine of humans and is highly prevalent in regions with poor sanitary conditions. The main strategy to control this helminth is by mass benzimidazole administration, however, periodic use of these drugs can select strains of parasites resistant to treatment. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the beta-tubulin isotype 1 gene located at codons 167, 198 and 200 have been associated with benzimidazole resistance in some nematodes. Previously, our group detected the presence of some of these SNPs in populations of soil-transmitted helminths collected in different locations in Brazil. Here, we evaluated the SNP at codon 167, which has recently been shown to be associated with failure of benzimidazoles to treat *N. americanus*. Our ARMS-PCR analyses were performed using 524 single *N. americanus* eggs from 48 patients' feces collected in six Brazilian states; however, we did not detect any mutated samples at codon 167. This study builds on previous work, helping us monitor the presence of resistance-related genotypes in Brazilian helminth populations. The data presented here can assist in the implementation of future control strategies.

**1. Introduction**

Hookworm infections represent a major public health problem, causing a disease burden of ~4 million disability-adjusted life years, with a global population of 406–480 million people infected (Stracke et al., 2020). Human ancylostomiasis is largely caused by the species *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Hasslinger, 1986), although there is a report describing the presence of *Ancylostoma cantium* eggs in human feces (Furtado et al., 2020). *Ancylostoma ceylanicum* also causes infections in humans and in dogs, especially in Southeast Asia and the Pacific (Stracke et al., 2020). Hookworm infections may cause anemia, anorexia, irritability, insomnia, and indisposition, resulting in a US \$139 billion/year economic cost from lost work productivity (Bartsch et al., 2016).

Among the strategies for helminth control, mass drug administration (especially with benzimidazoles) can progressively reduce the burden of infectious agents in the entire community and is considered effective in several regions around the world (Nemusu et al., 2017).

develop benzimidazole resistance.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the beta-tubulin isotype 1 gene located at codons 167 (TTC, TTT/phenylalanine → TAC, TAT/tyrosine), 198 (GAG, GAA/glutamic acid → GCG, GCA/alanine) and 200 (TTC/phenylalanine → TAC/tyrosine) have been associated with benzimidazole resistance in some nematodes (Kwa et al., 1994; Pritchard, 2001; Ghisi et al., 2007). Mutations at codons 198 and/or 200 in dog and human hookworm populations have been described in a number of countries, including Brazil (Furtado et al., 2014), Ghana (Orr et al., 2019) and Kenya (Dlawara et al., 2013). Although SNPs at codon 167 have been extensively investigated in *A. cantium* in Brazilian populations (Furtado and Rabelo, 2015a), in *A. braziliense* (Furtado et al., 2018) and in a benzimidazole-resistant *A. ceylanicum* strain obtained from an experimental model (Furtado et al., 2019a), to the best of our knowledge, the SNP at codon 167 has never been described in *A. cantium*, *A. braziliense* and *A. ceylanicum*. On the other hand, the SNP at codon 167 was detected in *N. americanus* populations from Ghana (Orr et al., 2019). In Brazil, samples of *N. americanus* obtained from various