

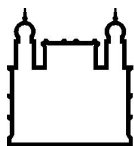
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Vigilância e Controle de Vetores

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LARVAS DE *Angiostrongylus* spp.
RECUPERADAS DE GASTRÓPODES

ALINE CARVALHO DE MATTOS

Rio de Janeiro
Outubro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

ALINE CARVALHO DE MATTOS

Diagnóstico molecular de larvas de
Angiostrongylus spp. recuperadas de gastrópodes

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores

Orientadoras: Prof. Dra. Suzete Rodrigues Gomes
Prof. Dra. Lângia Colli Montresor

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2019

Mattos, Aline Carvalho de.

Diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus* spp. recuperadas de gastrópodes / Aline Carvalho de Mattos. - Rio de Janeiro, 2019.
xx, 65f. f.; il.

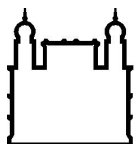
Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2019.

Orientadora: Suzete Rodrigues Gomes.
Co-orientadora: Lângia Colli Montresor.

Bibliografia: f. 52-58

1. Diagnóstico molecular. 2. nematódeos. 3. angiostrongilíases. 4. gastrópodes. 5. DNA barcode. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

AUTORA: ALINE CARVALHO DE MATTOS

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LARVAS DE *Angiostrongylus* spp.
RECUPERADAS DE GASTRÓPODES

ORIENTADORAS: Prof. Dra. Suzete Rodrigues Gomes

Prof. Dra. Lângia Colli Montresor

Aprovada em: 16/10/2019

EXAMINADORES:

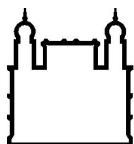
Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno - Presidente (IOC)

Prof. Dra. Raquel de Oliveira Simões (UFRRJ)

Prof. Dra. Karina Alessandra Morelli (UERJ)

Prof. Dr. Roberto do Val Vilela- Suplente (IOC)

Prof. Dra. Daniela de Pita Pereira - Suplente (IOC)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado profissional em Vigilância e Controle de Vetores de **Aline Carvalho de Mattos**, sob orientação da Dr^a. Suzete Rodrigues Gomes e coorientada pela Dr^a. Lângia Colli Montresor. Ao décimo sexto dia do mês de outubro de dois mil e dezenove, realizou-se às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado profissional intitulada: "**Diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus spp.*, recuperadas de moluscos.**", no programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Epidemiologia e controle de vetores, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Diagnóstico. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Rafaela Vieira Bruno - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Karina Alessandra Morelli - UERJ/RJ, Dr^a. Raquel de Oliveira Simões - UFRRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Daniela de Pita Pereira – IOC/FIOCRUZ e Dr. Roberto do Val Vilela – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado profissional. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Fernando Ariel Genta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2019.

Dr^a. Rafaela Vieira Bruno (Presidente da Banca): *Rafaela Vieira Bruno*

Dr^a. Karina Alessandra Morelli (Membro da Banca): *Karina Alessandra Morelli*

Dr^a. Raquel de Oliveira Simões (Membro da Banca): *Raquel de Oliveira Simões*

Dr. Fernando Ariel Genta (Coordenador do Programa): *Fernando Ariel Genta*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Enilza Carvalho de Mattos e Augusto César Teixeira de Mattos, que sempre desfrutarão do meu maior sentimento de gratidão, por todo esforço investido em minha formação acadêmica e moral.

Às minhas orientadoras, Suzete Rodrigues Gomes e Lângia Colli Montresor, pela parceria, amizade, competência e ajuda excepcionais dispensadas antes e durante a execução deste trabalho.

Aos demais membros da minha família consanguínea, pelos laços de amor essenciais à minha jornada, especialmente à minha filha Luana Mattos Buchmann por ter sido minha inspiração e fortaleza nos momentos de hesitação.

Às pesquisadoras Silvana Carvalho de Thiengo e Monica Ammon Fernandez pelos primeiros e essenciais ensinamentos na minha formação científica e pelo incentivo e amizade ao longo desses mais de 20 anos de convivência profissional.

Ao meu esposo, Fábio Fiebrig Buchmann pela parceria nos nove últimos anos, pela empatia na realização deste trabalho e pelo esforço para distrair a nossa “pequena” nas vezes em que precisei escrever em casa.

Às amigas e excelentes profissionais, Carolina Pereira Dias e Jéssica Corrêa-Antônio, pela ajuda em alguns dos procedimentos moleculares aqui realizados.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), especialmente à Elizangela Feitosa da Silva, Eduardo da Silva Cinilha, Heloísa Brandão da Silva, Marta Chagas Pinto e Paulo Sérgio Rodrigues pela ajuda em algumas etapas deste trabalho.

Aos Laboratórios de Patologia e de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do IOC e ao Laboratório de Helmintologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo fornecimento das amostras necessárias à realização deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Prosdocimi do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo Meis, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela ajuda na confecção dos iniciadores.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Vigilância e Controle de Vetores do IOC, pelos ensinamentos transferidos com competência e carinho ímpares.

À equipe da Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz pelo sequenciamento das amostras e pela utilização dos equipamentos para quantificação de DNA.

Aos Laboratórios de Biologia Molecular de Insetos e de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do IOC pela utilização dos equipamentos para a quantificação do DNA das amostras.

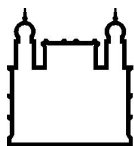
Às secretárias do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Vigilância e Controle de Vetores do IOC, Rosi Paim e Helenice Andrade, pela disponibilidade e simpatia no atendimento ao longo desses dois anos de curso.

Aos membros da banca por aceitarem com simpatia o convite para contribuir com a revisão deste trabalho, especialmente às Dras. Raquel de Oliveira Simões e Rafaela Vieira Bruno pela dupla revisão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

(Paulo Freire)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus* spp. recuperadas de gastrópodes

RESUMO

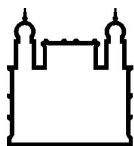
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES

Aline Carvalho de Mattos

Gastrópodes continentais atuam como hospedeiros intermediários de nematódeos de interesse para a saúde humana e animal, como *Angiostrongylus* spp. e outros pertencentes à superfamília Metastrongyloidea. O procedimento de digestão artificial é comumente utilizado para recuperar larvas de nematódeos em moluscos. Entretanto, essas formas imaturas não apresentam desenvolvidos os caracteres morfológicos necessários à sua identificação taxonômica. Como o produto da digestão artificial é ácido e contém restos de tecido do molusco, também surgem dificuldades para realizar o diagnóstico molecular destas larvas. Estudos pilotos mostraram ineficiência no diagnóstico molecular devido a variações na qualidade da amostra, baixa concentração de DNA e baixa eficiência nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). O objetivo deste trabalho foi aprimorar o diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus* spp. obtidas de moluscos. Assim, inicialmente, foi padronizado um método de preparo das larvas (triagem das larvas com micropipeta, somado ao ajuste do pH com PBS 1X). A partir destas amostras padronizadas quanto ao método de preparo, foram testados métodos de extração de DNA e diferentes iniciadores para a região do Citocromo c Oxidase subunidade I (COI). Foram utilizadas larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum* provenientes de ciclos mantidos em laboratório. Amostras do campo de *Aelurostrongylus abstrusus* também foram utilizadas para comparação. A importância do preparo da amostra foi testada através de reações de PCR realizadas em condições idênticas, com amostras

padronizadas e não padronizadas quanto ao preparo. Quanto aos testes de extração, após a realização de pilotos com diferentes protocolos, foram selecionados para testes comparativos, até a etapa de sequenciamento, dois protocolos com choque térmico e um utilizando kit comercial. Estes foram avaliados quanto à quantidade de DNA, eficiência da amplificação, tempo de realização e qualidade da sequência. Em uma terceira etapa foram testados três diferentes iniciadores para o COI. Os resultados demonstraram que após uma lavagem com PBS o produto da digestão artificial torna-se neutro (pH $7,29 \pm 0,13$) e que estas amostras, devidamente triadas, apresentam taxa de amplificação 60% maior. Este passo mostrou-se essencial para o sucesso das demais etapas. As amostras que foram submetidas à extração de DNA com os três protocolos selecionados resultaram em um produto que permitiu a amplificação do fragmento do COI nas reações de PCR, apesar das baixas concentrações de DNA, tendo sido possível também o diagnóstico molecular, por sequenciamento de Sanger, de 100% dessas amostras. Os protocolos com choque térmico apresentaram menor tempo de execução, custo e geração de resíduo químico. Os três iniciadores testados amplificaram com eficiência a região-alvo, viabilizando a identificação de *Angiostrongylus* spp. por sequenciamento. Os diferentes métodos de extração e iniciadores testados representam diferentes possibilidades para o diagnóstico de larvas de *Angiostrongylus* spp. e seu uso deverá levar em conta os recursos disponíveis (tempo e dinheiro) e o objetivo do estudo (diagnóstico ou pesquisa). A disponibilização de um protocolo eficiente e a possibilidade de redução dos custos no diagnóstico dos nematódeos associados a moluscos contribuem para incentivar as pesquisas na área e viabilizar estudos de vigilância epidemiológica e controle das angiostrongilíases.

Palavras-chave: DNA barcode; nematódeos; gastrópodes; angiostrongilíase



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION/PHD THESIS IN SURVEILLANCE AND VECTOR CONTROL

Aline Carvalho de Mattos

Continental gastropods act as intermediate hosts of nematodes of interest for human and animal health, such as *Angiostrongylus* spp. and other belonging to the superfamily Metastrongyloidea. The artificial digestion procedure is commonly used to verify the presence of nematode larvae in mollusks. However, these immature forms have not yet developed the necessary morphological characters for their taxonomic identification. As the product of artificial digestion is acidic and contains tissue remains of the mollusk also is often found difficulties to molecularly identify these larvae. Pilot studies have shown inefficiencies in molecular diagnostics due to variations in sample quality, low DNA concentration and low efficiency in the Polymerase Chain Reaction (PCR). The purpose of this project was to improve a molecular protocol to identify nematode larvae obtained from mollusks. Therefore, a sample preparation method was initially standardized (larval screening with micropipette and pH adjustment adding 1X PBS buffer). From these standardized samples, DNA extraction methods and different primers for amplification of Cytochrome c Oxidase subunit I region were tested. Third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* and *A. vasorum* from laboratory-maintained cycles were analyzed. Field samples from *Aelurostrongylus abstrusus* were also used for comparison. The importance of sample preparation was tested by PCR reactions performed under identical conditions with standard and non-standard samples. Regarding the extraction tests, after performing several pilots with different protocols, were selected for comparative tests until the sequencing step, two protocols with thermal shock and one using a commercial kit.

These were evaluated for DNA quantity, amplification efficiency and time to perform and sequence quality. In a third step three new initiators for the COI were tested. The results showed that after washing with PBS, the artificial digestion product becomes neutral (pH 7.29 ± 0.13) and that standardized samples, if properly screened, have a 60% higher amplification rate. This step proved to be essential for the success of the other stages. Samples that were subjected to DNA extraction using the three selected protocols resulted in a product that allowed for the amplification of the COI fragment in PCR reactions despite low DNA concentrations and also allowing the molecular diagnosis by Sanger sequencing from 100% of the sequencing samples, although was shown difference in the size of the obtained fragment. Protocols with thermal shock presented shorter execution time, cost and generation of chemical waste. The three primers tested efficiently amplified the target region, enabling the identification of *Angiostrongylus* spp. by sequencing. The different primers and extraction methods tested represent different possibilities for the diagnosis of *Angiostrongylus* spp. and its use should take into account available resources (time and money) and the purpose of the study (diagnosis or research). The availability of an efficient protocol and the possibility of reducing the diagnosis cost of mollusks-associated nematodes, contribute to encourage research in the area and enable studies of epidemiological surveillance and control of the angiostrongyliasis.

Keywords: DNA barcode; nematodes; gastropods; angiostrongyliasis

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Angiostrongilíases.....	1
1.2 Identificação molecular de nematódeos e região do DNA escolhida para análise.....	3
1.3 Justificativa.....	5
2 OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Obtenção das amostras.....	8
3.2 Verificação do pH de amostras neutralizadas e não neutralizadas.....	9
3.3 Padronização do processo de triagem das larvas.....	10
3.4 Avaliação da influência do preparo das amostras na PCR.....	11
3.5 Teste de diferentes métodos de extração de DNA de larvas L3 de <i>Angiostrongylus</i> spp.	12
3.5.1 Métodos de extração testados no Piloto 1.....	12
3.5.2 Métodos de extração testados no Piloto 2.....	13
3.5.3 Métodos de extração selecionados para o teste final.....	14
3.6 Seleção dos iniciadores para diagnóstico de <i>Angiostrongylus</i> spp.....	15
3.7 Desenvolvimento de novos iniciadores.....	16
3.8 Análise comparativa da eficiência dos novos iniciadores.....	16

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1	Verificação do pH das amostras.....	198
4.2	Avaliação da influência do preparo das amostras na eficiência da PCR.....	199
4.3	Teste de diferentes métodos de extração de DNA.....	20
4.3.1	Métodos de extração - Piloto 1.....	20
4.3.2	Métodos de extração - Piloto 2.	24
4.3.3	Métodos de extração selecionados (teste final).....	28
4.4	Seleção dos iniciadores para a identificação de <i>Angiostrongylus</i> spp.....	35
4.5	Desenvolvimento de novos iniciadores.....	36
4.6	Análise comparativa da eficiência dos iniciadores para a amplificação das larvas.....	39
4.6.1	Análise das sequências com iniciadores Bowles-Modificado..	40
4.6.2	Análise das sequências com iniciadores Prosser-Modificado.	41
4.6.3	Análise das sequências com iniciadores novos.....	42
4.7	Análise comparativa das sequências das demais espécies com os iniciadores propostos	46
4.8	Análise da distância genética entre as espécies estudadas	47
5	CONCLUSÕES.....	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7	APÊNDICES E/OU ANEXOS	59
7.1	Detalhamento dos métodos com nitrogênio líquido realizados no Piloto 1.....	59
7.2	Detalhamento do método realizado com kit no Piloto 1.....	60

7.3	Detalhamento dos métodos com pérolas de zircônio realizados no Piloto 2.....	61
7.4	Detalhamento dos métodos com miçanga e freezer realizados no Piloto 2.....	62
7.5	Dados brutos das medições em NanoDrop, dos testes do segundo Piloto 2.....	63
7.6	Protocolo sugerido para estudos de barcode de <i>Angiostrongylus</i> spp.	64
7.7	Protocolo sugerido para diagnóstico de rotina de <i>Angiostrongylus</i> spp.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Géis dos testes de neutralização do pH das amostras	19
Figura 2- Géis dos protocolos de extração do Piloto 1.....	22
Figura 3- Gel dos protocolos de lise mecânica do Piloto 2.....	27
Figura 4- Gel dos protocolos de extração com choque térmico.....	27
Figura 5- Gel da PCR da extração com o Protocolo 8	28
Figura 6- Fluxograma dos pilotos realizados e protocolos selecionados.....	29
Figura 7- Gel da extração dos Protocolos 1, 2 e 6.....	31
Figura 8- Gel comparativo das amostras extraídas por choque térmico.....	31
Figura 9- Gel das amostras extraídas com kit comercial.....	32
Figura 10- <i>Print screen</i> do programa Oligo7, mostrando o auto-anelamento do iniciador Prosser-Modificado.....	36
Figura 11- <i>Print screen</i> do programa Primer3plus, mostrando o teste com os iniciadores Bowles-Modificado.....	38
Figura 12- Localização dos três iniciadores desenvolvidos na região COI.....	38
Figura 13- Gel do teste de diluição das amostras.....	39
Figura 14- Gel da PCR com os iniciadores Bowles-Modificado.....	40
Figura 15- Gel da PCR com os iniciadores Prosser-Modificado.....	40
Figura 16- Gel da PCR com os iniciadores Novos.....	40
Figura 17- <i>Print screen</i> do <i>blast</i> de <i>A. cantonesis</i> com Bowles-Modificado.....	44
Figura 18- <i>Print screen</i> do <i>blast</i> de <i>A. cantonesis</i> com Prosser-Modificado.....	45
Figura 19- <i>Print screen</i> do <i>blast</i> de <i>A. cantonesis</i> com iniciadores novos.....	46
Figura 20- Matrizes de distância genética com os iniciadores desenvolvidos.....	47
Figura 21- Gel da amplificação com uma larva de <i>Angiostrongylus</i> spp., com os	

iniciadores novos.....	48
Figura 22- Gel da amplificação com uma larva de <i>Angiostrongylus</i> spp., com os iniciadores Prosser-Modificado.....	48
Figura 23- Gel da amplificação com uma larva de <i>Angiostrongylus</i> spp., com o iniciador de Bowles-Modificado.....	49
Figura 24- PCR dos iniciadores desenvolvidos com amostras de moluscos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do pH de amostras de digestão artificial não neutralizadas e após neutralização com solução salina tamponada.....	18
Tabela 2 - Resultado da quantificação por espectrometria dos métodos de extração testados no Piloto 1, com os tempos de execução.....	23
Tabela 3 - Médias dos parâmetros da quantificação por espectrometria dos métodos realizados no Piloto 2.....	24
Tabela 4 - Resultado das quantificações de DNA com Qubit nas amostras do Piloto 2.....	25
Tabela 5 - Resultado da quantificação com Qubit, dos métodos de extração testados até a etapa de sequenciamento de Sanger.....	30
Tabela 6 - Resultado do sequenciamento do gene COI, utilizando os primers Prosser-Modificados a partir de DNA com três diferentes métodos de extração: kit comercial e dois métodos de choque térmico.....	33
Tabela 7 - Resultado da análise da eficiência dos iniciadores e regiões de interesse para 20 sequências de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> com o tamanho do fragmento obtido (número de pares de bases), número de amostras sequenciadas com sucesso (sequências boas), número de sequências ruins (não aproveitadas) e número de amostras identificadas através do <i>blast</i> da sequência no GenBank.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LRNEM	Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
COI	Citocromo c Oxidase subunidade I
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
L3	Larva de terceiro estágio

1 INTRODUÇÃO

1.1 Angiostrongilíases

Mais de 60 espécies do Filo Nematoda utilizam moluscos como hospedeiros intermediários (Grewal et al., 2003). No entanto, o parasitismo por nematódeos ainda é pouco estudado quando comparado às infecções por trematódeos (Morley, 2010). Mais de 80% dos nematódeos que utilizam moluscos como hospedeiros intermediários pertencem à superfamília Metastrongyloidea, que inclui o gênero *Angiostrongylus* Kamensky, 1905. Este gênero possui atualmente 23 espécies descritas, entre as quais *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) e *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, parasitos de roedores que podem causar as zoonoses angiostrongilíase cerebral e angiostrongilíase abdominal, respectivamente. Além dessas, quatro outras espécies do gênero estão registradas para o Brasil, como *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) que pode parasitar cães domésticos e canídeos silvestres e cujo registro de ocorrência tem sido crescente na última década (Morgan et al., 2005, Penagos-Tabares et al., 2018). As outras três espécies ocorrentes no Brasil são silvestres e existem poucos dados sobre elas (Eamsobhana et al., 2017; Valente et al., 2018).

No Brasil, diversas espécies de moluscos terrestres já foram encontradas naturalmente infectadas com *Angiostrongylus* spp. de importância médica, sendo seis espécies de caracóis: *Achatina fulica* Bowdich, 1822, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835), *Cornu aspersum* (Müller, 1774), *Cyclodontina fasciata* (Potiez & Michaud, 1838) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) e nove espécies de lesmas: *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885), *Deroceras laeve* (Müller, 1774), *Limax maximus* (Linnaeus, 1758), *Limacus flavus* (Linnaeus, 1758), *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1885), *Phyllocaulis soleiformis* (d'Orbigny, 1835), *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885), *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) e *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) (Graeff-Teixeira et al., 1993; Caldeira et al., 2007; Ohlweiler et al., 2010; Ramos-de-Souza et al., 2018; Rodriguez et al., 2018). A espécie de água doce *Pomacea lineata* (Spix in Wagner, 1827) também já foi encontrada infectada (Thiengo et al., 2010).

As angiostrongilíases acometem o homem de forma acidental, pela ingestão de larvas de terceiro estágio (L3) presentes em alimentos contaminados com o muco

de moluscos infectados ou pela ingestão acidental ou intencional dos moluscos ou dos hospedeiros paratênicos crus ou mal cozidos (Rebello et al., 2018).

A angiostrongilíase abdominal tem como principais sintomas dor abdominal aguda, eosinofilia e mialgia (Romero-Alegría et al., 2014). No Brasil existem casos reportados dessa doença nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e no Distrito Federal (Morera e Graeff-Teixeira, 1999; Ohlweiller et al., 2010). As regiões Sul e Sudeste são as mais afetadas, com uma média de cinco casos relatados por ano (Morera e Graeff-Teixeira, 1999; Ohlweiller et al., 2010).

A angiostrongilíase cerebral é considerada uma doença emergente no país, havendo casos humanos confirmados nos estados do Espírito Santo (3 casos), Rio Grande do Sul (1), Pernambuco (9), Rio de Janeiro (2) Paraná (1), São Paulo (18) (Morassutti et al., 2014) e, mais recentemente, no Amapá (1) (Barbosa et al., 2019). Para os casos registrados nos estados do Amapá, Espírito Santo, Pernambuco e São Paulo, os autores destacaram a presença de exemplares da espécie *A. fulica* infectados por *A. cantonensis* (Caldeira et al., 2007; Thiengo et al., 2008; 2010; Lima et al., 2009; Barbosa et al., 2019). Essa espécie, conhecida popularmente como “Caramujo-Gigante-Africano”, foi introduzida no Brasil na década de 80 e atualmente apresenta uma ampla distribuição em nosso território. Morassutti e colaboradores (2014) chegaram a associar a expansão de *A. fulica* ao aumento dos casos humanos da meningite eosinofílica no Brasil.

A confirmação da presença de *A. cantonensis* ocorrendo naturalmente nos moluscos constitui uma das primeiras ações epidemiológicas necessárias a partir da constatação de um caso humano dessa parasitose. A identificação morfológica de larvas de nematódeos, contudo, é inexecuível, uma vez que estas fases imaturas não apresentam as características diagnósticas desenvolvidas. Assim, para a identificação morfológica, é necessário obter as formas adultas, a partir da infecção experimental de roedores com larvas de terceiro estágio (L3). No entanto, este procedimento tem várias desvantagens: longo período para o desenvolvimento do nematódeo até a fase adulta (25 a 45 dias); grande número de larvas necessárias para a infecção; impossibilidade de realizar o diagnóstico das espécies de importância veterinária que utilizam outros hospedeiros definitivos, como *A. vasorum*; e a possibilidade do roedor morrer antes da necropsia. A identificação molecular, por sua vez, também oferece obstáculos, pois as larvas são obtidas por digestão

artificial do molusco com ácido clorídrico, gerando um produto ácido e contaminado com o DNA do molusco e com o seu conteúdo estomacal. Além disso, é comum o encontro de moluscos infectados por mais de uma espécie de nematódeo (Oliveira et al. 2010, 2015; Constantino-Santos et al. 2015; Ramos-de-Souza et al., 2018), o que requer uma seleção minuciosa das larvas recuperadas do molusco.

1.2 Identificação molecular de nematódeos e a região do DNA escolhida para análise

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem auxiliado na identificação de nematódeos. No entanto, pode haver dificuldades, as quais tem início ainda na etapa da extração de DNA, pois esses animais possuem uma cutícula protetora acima da epiderme. Essa cutícula, além de representar mais uma barreira mecânica, possui resistência à solubilização, mesmo em condições fortemente desnaturantes, devido à presença de cuticlina em sua composição (Fetterer & Roads, 1993).

Entre as técnicas moleculares disponíveis, algumas permitem apenas a detecção (presença ou ausência) do parasita alvo, como: LAMP (Chen et al., 2011; Liu et al., 2011), PCR em tempo real (Qvarnstrom et al., 2010) e PCR-RFLP (Caldeira et al., 2003). Estas técnicas não permitem, contudo, o conhecimento de outras espécies de nematódeos que possam estar ocorrendo nos moluscos, ocasionando a perda de informações epidemiologicamente importantes, como a compreensão da diversidade genética de *Angiostrongylus* spp. no Brasil.

O sequenciamento genético, tem se mostrado uma ferramenta útil para a identificação de nematódeos (Blaxter et al., 1998; Eamsobhana, et al., 2017; Prosser et al., 2013), além de permitir o conhecimento da variabilidade genética das espécies. Diversos marcadores genéticos têm sido utilizados na identificação de nematódeos. Entre estes, os mais comuns têm sido a região COI (Folmer et al., 1994; Prosser et al., 2013), a subunidade menor do ribossomo (SSU) (Blaxter et al., 1998; Floyd et al., 2002) e a região espaçadora interna do DNA ribossomal (ITS) (Powers et al., 1997; Qvarnstrom et al., 2010).

Anteriormente à escolha dos marcadores a serem testados e comparados neste estudo, foi realizado um levantamento daqueles já utilizados para *Angiostrongylus* spp. na literatura (Quadro 1). Para testar a viabilidade de utilização no diagnóstico de amostras no Laboratório de Referência Nacional para

Esquistossomose-Malacologia (LRNEM), diferentes iniciadores para essas regiões foram testados, entre 2011 e 2015, e a síntese dos resultados da eficiência destes iniciadores nos testes realizados com essas amostras é mostrada no Quadro 2.

Quadro 1 – Levantamento dos iniciadores utilizados para a identificação de *Angiostrongylus* spp. no LRNEM-IOC, com base na literatura.

Referência Bibliográfica	Região alvo	Iniciador (nome)	Grupo taxonômico para o qual foi direcionado
Bowles et al., 1992	COI	COI_F/COI_R	<i>Fasciola hepatica</i> Say, 1817
Folmer et al., 1994	COI	HCO/ LCO	Metazoários
Floyd et al., 2002	SSU	SSU F07/SSU R09	Nematódeos
Qvarnstrom et al., 2010	ITS	AcanITS1F1/AcanITS1R1	<i>A. cantonensis</i>
Prosser et al., 2013	COI	Nem1_t1/Nem3_t1	Nematódeos

Quadro 2 - Dados gerados pelo LRNEM no período entre 2011 e 2015: testes realizados com iniciadores descritos na literatura para identificar espécies do Filo Nematoda, com descrição dos resultados obtidos e análise dos resultados.

Referência Bibliográfica	Região-alvo	Amostras do LRNEM (L3)	Resultados obtidos
Folmer et al. (1994)	COI	Amostras de <i>A. cantonensis</i> obtidas em <i>A. fulica</i> em 2011 (n = 10)	Das 10 amostras testadas, apenas uma amplificou para <i>A. cantonensis</i> . Em algumas amostras, foi amplificado o DNA do molusco e até da alface utilizada na alimentação das colônias.
Qvarnstrom et al. (2010)	ITS	Amostras testadas entre outubro e novembro de 2013 (n = 61)	Mostrou uma divergência pequena entre as espécies. Embora 43 de 50 amostras de <i>A. cantonensis</i> tenham amplificado, as amostras de <i>A. vasorum</i> (n=3) não amplificaram e as de <i>A. costaricensis</i> (n=8) apresentaram bandas muito fracas ou não amplificaram.
Bowles et al. (1992)	COI	Amostras de <i>A. costaricensis</i> (n = 10) e <i>A. cantonensis</i> (n = 4) testadas entre 2013 e 2014	O protocolo de Monte et al. (2012) foi reproduzido, sendo: 04 amostras de <i>A. costaricensis</i> e 04 de <i>A. cantonensis</i> , onde apenas 02 de <i>A. cantonensis</i> e 01 de <i>A. costaricensis</i> amplificaram. Em outro teste, com 06 amostras <i>A. costaricensis</i> , nenhuma amplificou.
Fontanilla e Wade (2007)	SSU	Amostras testadas entre julho e setembro de 2015 (n = 34)	A reação de PCR funcionou para 33 de 34 amostras analisadas. No entanto, esta região não diferenciou <i>Angiostrongylus</i> spp. entre si.
Prosser et al. (2013)	COI	PCR realizadas entre abril e maio de 2015 (n = 81)	As amostras amplificam bem, mas a formação de dímeros esteve presente em todas as reações, afetando a qualidade das sequências obtidas e fazendo com que muitas não fossem aproveitadas.

1.3 Justificativa

A partir dos resultados obtidos nos testes realizados pelo LRNEM, verificou-se que a região do COI apresentou melhores resultados para a identificação específica de *Angiostrongylus* spp., em comparação com o gene nuclear ITS e com a subunidade menor do ribossomo (SSU). Além das conhecidas vantagens do DNA mitocondrial, como: estar menos exposto à recombinação; apresentar herança haplóide (materna) e exibir uma taxa de mutação relativamente alta, resultando em uma maior variação genética interespecífica e uma variação intraespecífica comparativamente pequena (Elsasser et al., 2009), a literatura vinha apontando a eficiência dessa região para o barcode de nematódeos (Elsasser et al., 2009; Lv et al, 2009; Prosser et al, 2013). A escolha do gene COI também se justificou por apresentar uma boa representatividade de sequências de *Angiostrongylus* spp. depositadas nos bancos de dados genéticos.

A necessidade de desenvolvimento deste estudo ocorreu a partir de uma demanda do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose e Malacologia (LRNEM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)-Fiocruz por padronizar e aprimorar o diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus* spp. recuperadas de gastrópodes. O aumento dos casos de angiostrongilíase cerebral no Brasil e sua forte associação com o molusco *A. fulica*, despertaram o interesse do Ministério da Saúde quanto à ocorrência de *A. cantonensis* no país. Conseqüentemente, o LRNEM passou a ter uma grande demanda para a identificação de helmintos associados aos moluscos terrestres, com ênfase em *A. cantonensis*. Além disso, pesquisadores e estudantes de diferentes instituições do Brasil e da América Latina passaram a entrar em contato com o LRNEM, buscando informações relativas à pesquisa e à identificação de nematódeos de importância médica em gastrópodes.

Até 2013, devido às limitações relativas à identificação morfológica de larvas, a infecção experimental de roedores com larvas L3 foi a metodologia utilizada pelo LRNEM/IOC para a identificação específica dos nematódeos associados aos moluscos. Assim, entre 2009 e 2013 mais de 130 roedores foram utilizados para realizar o diagnóstico morfológico a partir do verme adulto. Além das desvantagens supracitadas quanto à utilização de roedores no diagnóstico, a imprevisibilidade quanto ao recebimento de amostras gerava dificuldades para a previsão de roedores, dificultando a obtenção desses animais junto ao biotério. Esta imprevisibilidade se deve à variação na quantidade de exames solicitados ao longo do ano, a qual tem relação com as variações sazonais nas populações de moluscos.

Dessa forma, a partir de 2010, o LRNEM/IOC passou a levantar recursos para adequar o espaço, se equipar e capacitar a equipe para implementar o diagnóstico molecular de *Angiostrongylus* spp. recuperados de moluscos. No entanto, além dos obstáculos já descritos quanto ao emprego da técnica de digestão artificial de moluscos, houve ainda uma grande dificuldade na amplificação e sequenciamento do DNA das larvas. Um levantamento das amostras do LRNEM enviadas para o sequenciamento em um período de dois meses mostrou que menos de 20% resultavam em sequências de boa qualidade. Numa análise posterior, utilizando dados de um período de oito meses, relacionados à qualidade do DNA extraído e à eficiência das reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) realizadas, observou-se que 2% das extrações de DNA tinham que ser repetidas, além da necessidade de se realizar mais de três reações de PCR por amostra, as quais usualmente resultavam na formação de dímeros de iniciadores.

Sob a suspeita de que a baixa eficiência nos procedimentos de extração, amplificação e sequenciamento de DNA teria como causa problemas metodológicos relacionados ao preparo das amostras e à eficiência do método de extração e dos iniciadores testados, fez-se necessária a busca de uma nova metodologia envolvendo: modificações nos procedimentos pré-extração; a otimização ou modificação do processo de extração (com a inclusão de etapas iniciais para quebrar a cutícula que protege externamente os nematódeos) e a análise de diferentes iniciadores, proporcionando a elaboração de um protocolo molecular eficiente para a identificação específica das larvas de nematódeos de interesse para a saúde pública e medicina veterinária, recuperadas de moluscos pelo de processo de digestão artificial. Além disso, buscou-se um protocolo mais simples e barato, que pudesse ser aplicado pelos laboratórios do serviço de saúde.

Portanto, o presente trabalho é uma resposta à demanda da população e do Ministério da Saúde por um diagnóstico mais rápido e eficaz, além de mais adequado aos princípios de ética na pesquisa, no sentido de eliminar o uso de roedores na rotina de diagnósticos do LRNEM/IOC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Aprimorar o diagnóstico molecular por sequenciamento (Sanger) de larvas de *Angiostrongylus* spp. obtidas de gastrópodes por processo de digestão artificial, para a aplicação no LRNEM/IOC e em outros laboratórios que realizam diagnóstico e/ou pesquisa.

2.2 Objetivos Específicos

- Demonstrar a influência do preparo da amostra (neutralização do pH e triagem das larvas) no sucesso do diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus* spp.

- Avaliar a eficiência, a rapidez e a exequibilidade de diferentes técnicas de extração de DNA.

- Comparar a eficiência de iniciadores disponíveis na literatura com aqueles propostos neste estudo (desenhados com base nos genomas de *Angiostrongylus* spp. ou modificados a partir de iniciadores propostos na literatura).

- Analisar as vantagens e desvantagens das diferentes metodologias testadas para diagnóstico molecular de larvas de *Angiostrongylus*, para que estas informações possam servir de subsídio para a escolha de métodos de pesquisa e diagnóstico de larvas de nematódeos recuperadas de gastrópodes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

Para a realização dos ensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio (L3) de *Angiostrongylus* spp., provenientes de ciclos mantidos nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do IOC (*A. cantonensis*), Laboratório de Patologia do IOC (*A. costaricensis*) e Laboratório de Helminologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (*A. vasorum*).

As larvas L3 foram obtidas de moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), através da técnica de digestão artificial de moluscos descrita em Graeff-Teixeira & Morera (1995), na qual fragmentos da parte mole do molusco são imersos em solução de HCl 0,7%, promovendo a digestão do tecido e a liberação das larvas. As larvas foram recuperadas após 15h da aplicação do método de sedimentação de Baermann-Moraes, após a solução contendo os fragmentos do tecido do molusco ter sido transferida para funis acoplados a peneiras forradas com gaze, nos quais foi acrescida água tipo II em quantidade suficiente para cobrir os fragmentos de tecido retidos na gaze. Ao final desse procedimento, foram coletados 10 mL do produto da digestão artificial de cada amostra, utilizando tubos Falcon de 15 mL, que foram centrifugados a 1.500 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o volume foi completado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) da marca Life Technologies (concentração inicial de 10X, pH 7.4), diluída para 1X, para a neutralização do conteúdo. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições de rotação e tempo, e transferidas para uma placa de Petri para a triagem das larvas (ver item 3.3).

Foram realizados ao todo 26 procedimentos de digestão artificial (com cinco exemplares de *B. glabrata* cada), sendo 15 amostras de moluscos infectados por *A. cantonensis* e 11 por *A. vasorum*.

As larvas da espécie *A. costaricensis* foram fornecidas pelo Laboratório de Patologia do IOC já dispostas no conteúdo da digestão artificial, em uma única amostra com cerca de 2000 larvas L3.

Para comparação dos iniciadores testados neste trabalho também foram analisadas amostras de campo, obtidas a partir de exemplares de *A. fulica* coletados no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro/RJ, do metastrongilídeo da espécie *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898). Este nematódeo apresenta importância veterinária (parasita de felídeos) e pertencente a um gênero proximamente relacionado à *Angiostrongylus*, que também é comumente encontrado em moluscos no Brasil (Thiengo et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Penagos-Tabares et al., 2018).

3.2 Verificação do pH de amostras neutralizadas e não neutralizadas

Considerando a possibilidade de que as dificuldades nos ensaios moleculares com as larvas obtidas por digestão artificial pudessem ser decorrentes de fatores relacionados às características e ao método de preparação das amostras, como: (1) a acidez do produto da digestão; (2) a presença de detritos visíveis nas amostras; (3) a possibilidade de mistura de espécies na amostra devido à presença de diferentes espécies de larvas em um mesmo molusco (co-infecção) e (4) amostras contendo um grande volume de líquido proveniente da digestão artificial, buscamos alternativas para corrigir os problemas verificados na rotina de diagnósticos do LRNEM/IOC. Neste laboratório, as amostras que vinham apresentando problemas no diagnóstico molecular eram preparadas diretamente a partir do produto da digestão artificial, lavado com água tipo II, o que resultava em um produto extremamente ácido (pH $2,93 \pm 0,85$). Assim, fez-se necessário elaborar uma estratégia para neutralizar o pH das amostras para a extração de DNA, tendo, para isso, sido utilizada uma solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X).

Para verificar a eficiência dessa neutralização da amostra, foi realizado um teste no qual comparamos o pH de amostras neutralizadas com PBS 1X com o de amostras não neutralizadas. Assim, foi realizada a digestão de 10 amostras de *B. glabrata* (contendo cinco moluscos cada amostra) infectadas com *A. cantonensis*. Ao final deste procedimento, 10 mL do produto da digestão artificial de cada amostra foram coletados e o pH foi verificado das seguintes maneiras: (1) diretamente após a coleta; (2) após cada uma de um total de três lavagens com água tipo II, onde em cada lavagem, a amostra foi centrifugada a 1.500 rpm por 8 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o volume novamente completado com água tipo II; (3) após cada uma de um total de três lavagens com PBS 1X, onde o conteúdo de cada

amostra foi centrifugado, conforme descrito acima. Também foi mensurado o pH da solução PBS 1X utilizada, livre de amostra.

Para essas medições foi utilizado um medidor de pH e condutividade de bolso, marca AKSO, modelo AK59, calibrado conforme as instruções do fabricante.

Convém ressaltar que uma solução-estoque de tampão fosfato-salino 10X (PBS 10X) também pode ser facilmente preparada, dissolvendo-se 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na₂HPO₄ e 2,4 g de KH₂PO₄ em 800 mL de água destilada, para uma completa dissolução, seguida da adição de água destilada até que o volume final da solução atinja 1 litro.

3.3 Padronização do processo de triagem das larvas

Uma vez comprovada a acidez do pH das amostras, foi também padronizado um método para a triagem das larvas. Para isso, foram utilizadas amostras de *A. cantonensis* (L3) obtidas por digestão artificial de moluscos da espécie *B. glabrata*, conforme o item (3.1). Ao final deste procedimento, o produto da digestão artificial foi coletado, neutralizado conforme as condições descritas no item (3.2), transferido para uma placa de Petri e, quando necessário, diluído com PBS 1X para uma melhor visualização, contagem e seleção das larvas.

Para evitar que as amostras tivessem detritos visíveis, as larvas foram selecionadas cuidadosamente, com uma micropipeta monocanal de 20 µL, evitando que fragmentos de tecido e outros detritos fossem aspirados. Em seguida, foram transferidas para uma placa escavada para a seleção de larvas morfológicamente iguais (L3). Com a micropipeta ajustada para aspirar até 10 µL, as larvas foram alocadas em uma nova placa escavada (10 L3 por poço) e aspiradas novamente, evitando-se aspirar líquido excedente, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL estéreis e congeladas. Alíquotas para testes contendo apenas uma larva também foram preparadas por esta metodologia.

Esse procedimento de triagem das larvas, somado ao ajuste do pH das amostras, constituíram o método de preparo das amostras utilizadas neste estudo.

Ao todo, 325 alíquotas de larvas L3 (contendo 1 e 10 L3) foram preparadas para a realização dos testes, sendo: 100 alíquotas de 10 larvas e 25 alíquotas de

uma larva para as espécies *A. cantonensis* e *A. vasorum*; e 50 alíquotas de 10 larvas e 25 alíquotas de uma larva para a espécie *A. costaricensis*. Adicionalmente, foram preparadas 20 alíquotas, com 10 L3 de *A. cantonensis* cada, para a realização dos testes de verificação da influência do pH nas reações de PCR (item 3.2).

Das 345 alíquotas de L3 preparadas para os experimentos 228 tiveram o DNA extraído, tendo sido amplificadas um total de 168, sendo: 102 de *A. cantonensis*, 33 de *A. costaricensis* e 33 de *A. vasorum*. Dentre as amostras amplificadas, 59 foram sequenciadas, sendo: 27 de *A. cantonensis*, 15 de *A. costaricensis* e 14 de *A. vasorum*.

3.4 Avaliação da influência do preparo das amostras na eficiência da PCR

Para verificar a influência do método de preparo da amostra (ajuste do pH e triagem das larvas) sobre a eficiência da PCR, foi realizado um teste a partir de 20 amostras de larvas obtidas do produto da digestão artificial de exemplares de *B. glabrata* infectados com *A. cantonensis*, sendo 10 lavadas apenas com água tipo II e outras 10 submetidas ao processo de neutralização com PBS 1X.

As amplificações por PCR ocorreram sob as mesmas condições: 12.5µL de Master Mix da marca Promega (*Go Taq G2 Colorless Master Mix*), 1,5 µL de cada iniciador (*Foward* e *Reverse*) do terceiro par de iniciadores constituintes do coquetel proposto em Prosser et al. (2013), modificados (ver item 4.5), na concentração inicial de 5µM, além de água ultrapura da marca Invitrogen (*UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water*) suficiente para completar o volume de 20µL de mistura por amostra. A estes 20µL foram adicionados 5µL de DNA, obtidos a partir da extração de 10 larvas L3 por amostra, totalizando um volume final de 25µL de reação por amostra.

A utilização de Master Mix nas amplificações (no qual todos os componentes da reação já vêm reunidos, incluindo a enzima Taq Polimerase) foi baseada no propósito de otimizar a padronização dos ensaios, reduzindo o erro de pipetagem. Para o caso da reprodução deste protocolo sem fazer o uso do Master Mix, as seguintes concentrações finais deverão ser utilizadas para cada reação: 0,2mM de mix de dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 0,1µM de cada primer, 1,25 U/reação de Taq e 1X Buffer.

As amostras foram amplificadas em termociclador da marca Applied Biosystem, modelo Veriti 96-Well, com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de 95°C por 40 segundos, 45°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto; 1 ciclo final de 72°C por 5 minutos.

A eletroforese se deu em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão SB (borato de sódio), diluído para 1X. Para a corrida, foi utilizada uma fonte marca GSR, modelo 300STD, acoplada a uma cuba horizontal da marca de DIGEL, modelo DGH-12, com volume de tampão de 550 mL. A corrente aplicada foi de 180mA, a tensão foi de 180v e a potência de 50w.

O resultado da eletroforese foi visualizado por meio de um transluminador UV, modelo UVT-312, marca UVTrans. As fotos foram obtidas utilizando-se um fotodocumentador de géis, marca MBS, modelo 1.5M, acoplado ao transluminador e conectado a um laptop através do *software* WiseCapture.

3.5 Teste de diferentes métodos de extração do DNA de larvas L3 de *Angiostrongylus spp.*

3.5.1 Métodos de extração testados no Piloto 1:

Em 2016 foi realizado um experimento piloto, o qual será referido neste trabalho como Piloto 1. Nesse experimento, para cada um dos protocolos realizados foram utilizadas três amostras, contendo dez larvas L3 de *A. costaricensis* cada. Na ocasião foram testados cinco protocolos de extração de DNA diferentes conforme a breve descrição abaixo:

Protocolo 1- método de choque térmico incluindo três ciclos alternados de resfriamento em nitrogênio líquido e aquecimento em termobloco a 95°C.

Protocolo 2 - kit comercial para extração de DNA de tecido animal “DNeasy Blood and Tissue” da marca Qiagen, no qual foram testados três diferentes tempos de incubação na etapa de lise do tecido.

Protocolo 3 - método combinado incluindo uma etapa de lise mecânica através do uso de pérolas de zircônio de 0,7mm, seguida de duas etapas de choque térmico, centrifugação e incubação em proteinase K.

Protocolo 4 - método combinado incluindo uma etapa inicial de choque térmico seguido do uso do kit comercial Qiagen.

Protocolo 5 - método combinado incluindo uma etapa inicial de lise mecânica, com pérolas de zircônio, seguido do uso do kit comercial Qiagen.

Todos estes protocolos estão detalhados no item 7, Anexos 7.1, 7.2 e 7.3.

A qualidade do produto da extração utilizando os protocolos do Piloto 1 foi avaliada de três formas: (1) mensuração da presença de ácidos nucleicos e contaminantes em espectrofotômetro de microvolumes – NanoDrop 2000, marca Thermo Scientific; (2) avaliação do tempo decorrido para a realização de cada técnica de extração; (3) realização de uma PCR com todas estas amostras, simultaneamente, utilizando os mesmos reagentes e equipamentos. Esta PCR foi realizada nas mesmas condições descritas no item 3.4, bem como a eletroforese.

3.5.2 Métodos de extração testados no Piloto 2:

A partir dos resultados desse piloto, foram selecionados novos protocolos a serem testados e um novo piloto (Piloto 2) foi realizado (detalhes descritos no Anexo, itens 7.4 e 7.5), para o qual foram utilizadas amostras da espécie *A. cantonensis*, contendo dez larvas L3 cada.

Nesse segundo piloto foram repetidos três protocolos selecionados a partir do Piloto 1 (Protocolo 1, Protocolo 2 e Protocolo 3) e ao Protocolo 3 foi incluída uma variação, na qual foram invertidas as etapas de homogeneização em vortex e centrifugação, a qual chamaremos de **Protocolo 3B**.

No Piloto 2, foram incluídos ainda os seguintes protocolos de extração:

Protocolo 6 - método de choque térmico em freezer, sendo três ciclos alternados de resfriamento em freezer a 0°C e aquecimento em termobloco a 95°C, com duração de 20 minutos para cada.

Protocolo 7 - método de lise mecânica com a mesma metodologia descrita no Protocolo 3, substituindo as pérolas de zircônio por miçangas de 2 mm (Anexo 7.4). Neste protocolo, duas quantidades de miçangas foram testadas: **(7A)** uso de três miçangas, **(7B)** uso de cinco miçangas. Além disso, foi testada uma metodologia invertendo-se as etapas de homogeneização em vortex e centrifugação **(7C)**.

Protocolo 8 - método de lise química em que é utilizada solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, descrito em Margam et. al. (2010), precedido de uma etapa de lise mecânica, sendo: **(8A)** lise mecânica com 3 miçangas, **(8B)** lise mecânica com pérolas de zircônio, **(8C)** lise mecânica por 1 minuto de imersão em nitrogênio líquido e maceração com um pistilo.

A qualidade do produto da extração foi avaliada de três formas: (1) mensuração em espectrofotômetro de microvolumes – NanoDrop 2000, marca Thermo Scientific; (2) quantificação fluorométrica – Quibit 4, marca Thermo Scientific; (3) realização de uma PCR, utilizando as mesmas condições descritas no item 3.4.

3.5.3 Métodos de extração selecionados para o sequenciamento (teste final):

A partir dos resultados obtidos com os protocolos testados no Piloto 2, foram selecionados os protocolos a serem realizados em um teste final dos métodos de extração de DNA. Essa seleção levou em consideração os resultados quanto à pureza do DNA das amostras extraídas, mas foram também considerados os seguintes parâmetros: (1) o tempo de execução da técnica; (2) o custo; (3) a geração de resíduos químicos.

Para esse teste final, foram utilizadas 10 amostras de *Angiostrongylus* spp., sendo: quatro de *A. cantonensis*, três de *A. costaricensis* e três de *A. vasorum*, por protocolo de extração testado.

O teste final dos métodos de extração de DNA foi analisado em quatro etapas: (1) avaliação da eficiência da PCR, onde o DNA extraído com cada um dos protocolos foi amplificado em reações de PCR em condições padronizadas e visualizado em gel de agarose, seguindo os procedimentos descritos no item 3.4; (2) resultado da quantificação, onde o DNA extraído foi quantificado por fluorimetria (Qubit); (3) análise da sequência, onde o produto amplificado foi purificado com o kit comercial de purificação de DNA “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” da marca GE, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante, e enviado para sequenciamento (método Sanger) na Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA - RPT01A (Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ), conforme

metodologia descrita em OTTO et al. (2008) e (4) eficiência no diagnóstico da espécie do nematódeo.

O DNA dos exemplares da espécie *Ae. abstrusus* foi extraído com o Protocolo 2 (kit) e amplificado conforme descrito no item 3.4. Os procedimentos de purificação e sequenciamento do DNA foram executados conforme descrito na etapa (3) do parágrafo anterior.

3.6 Seleção dos iniciadores para a identificação de *Angiostrongylus* spp.

Considerando os resultados do LRNEM nos testes realizados com os iniciadores disponíveis na literatura, mostrados no Quadro 2, foi montada uma placa para sequenciamento com os iniciadores para a região do COI. Para isso, foram utilizadas 11 amostras de *A. cantonensis* e duas de *A. costaricensis*, onde todas tiveram o DNA extraído com kit comercial (Protocolo 2). Destas, cinco amostras da espécie *A. cantonensis* foram amplificadas e enviadas para o sequenciamento com o par de iniciadores proposto por Bowles et al. (1992). As demais foram amplificadas com os iniciadores do coquetel proposto no artigo sobre *barcoding* de nematódeos de Prosser et al. (2013) em conjunto, como se segue: 1) uma amostra de *A. cantonensis* e uma de *A. costaricensis* foram enviadas para o sequenciamento com a terminação M13, conforme descrito no referido artigo, após amplificação com os iniciadores do coquetel testados em conjunto; 2) uma amostra de *A. costaricensis* foi enviada para o sequenciamento com os iniciadores do coquetel em conjunto; 3) oito amostras de *A. cantonensis* e duas de *A. costaricensis* foram enviadas para o sequenciamento com cada par de iniciadores isoladamente, para verificar qual deles teria o melhor desempenho para as espécies-alvo deste estudo.

As reações de sequenciamento foram realizadas na Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA - RPT01A (Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ), conforme metodologia descrita em Otto et al. (2008).

Além da qualidade das sequências obtidas, também foi realizada a análise de similaridade genética entre as espécies de *Angiostrongylus* enviadas na placa montada e aquelas depositadas no GenBank, através da ferramenta *Basic Alignment Search Tool* (BLAST).

3.7 Desenvolvimento de novos iniciadores

A partir do resultado do sequenciamento das amostras dispostas na placa montada para teste, o terceiro par de iniciadores (Nem3_t1) descrito em Prosser et al. (2013) e o par de iniciadores (COI_F/COI_R) descrito em Bowles et al. (1992), que amplifica outra região do COI, foram selecionados para a realização de modificações, a fim de tentar reduzir a formação de dímeros nas reações de PCR e aumentar a especificidade do diagnóstico. As sequências desses pares de iniciadores foram então analisadas, utilizando-se os softwares livres Oligo 7 e Primer3plus, respectivamente, para investigar: a) se esses iniciadores eram complementares à sequência das nossas espécies-alvo; b) se possuíam regiões homólogas, causando o auto anelamento; c) se havia a formação de alças, devido ao excesso de bases degeneradas.

Além disso, foi desenhado um novo iniciador com base nas sequências dos genomas mitocondriais completos de *Angiostrongylus* spp. disponíveis no *GenBank*.

3.8 Análise comparativa da eficiência dos novos iniciadores

A eficiência dos três iniciadores desenvolvidos neste trabalho (dois modificados e um novo) foi avaliada através dos seguintes parâmetros: 1- taxa de amplificação bem sucedidas das amostras; 2- intensidade do fragmento amplificado, quando visualizado em gel de agarose; 3- a qualidade das sequências obtidas no sequenciamento de DNA; 4- o potencial na identificação das espécies alvo.

A qualidade das sequências foi analisada de acordo com os seguintes critérios: definição dos picos na linha de base (pela análise dos cromatogramas) e tamanho das sequências geradas.

Para reduzir possíveis fontes de variação, tornando a avaliação mais homogênea, os testes quanto a eficiência de amplificação, bem como aqueles quanto a qualidade da reação de sequenciamento, foram realizados a partir de amostras processadas por um mesmo método de extração (Protocolo 2 - kit comercial com 4 horas de incubação), bem como pertencentes a apenas uma única espécie (*A. cantonensis*). Para esses testes foram utilizadas as mesmas dez amostras, contendo dez larvas L3 cada.

As amplificações por PCR ocorreram nas mesmas condições descritas no item 3.4 para os iniciadores Prosser-Modificado e Iniciador-Novo, diferindo apenas quanto à temperatura de anelamento na ciclagem (45°C e 51°C, respectivamente). Já a ciclagem com o par de iniciadores Bowles-Modificado diferiu na temperatura de anelamento (55°C) e por conter 10 ciclos a mais na fase de extensão.

Para cada uma destas amostras os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direções, ou seja, com os iniciadores *forward* e *reverse*. Desta forma, obtivemos um total de 20 sequências de *A. cantonensis* para a avaliação da qualidade da sequência gerada por cada par de iniciadores testados.

A capacidade desses iniciadores em amplificar amostras contendo apenas uma larva de *Angiostrongylus* spp. também foi verificada.

A análise dos eletroferogramas foi realizada com o *software* Chromas, versão 2.6.5. Inicialmente, cada par de sequências complementares (*forward* e *reverse*) foi comparativamente analisado, com edições destacadas em letra minúscula. Em seguida, as sequências foram copiadas e reunidas em um arquivo de texto no formato FASTA e importadas no programa Clustal X (1.81), onde foram alinhadas. Posteriormente, pequenas edições foram feitas no programa BioEdit versão 7.2.5, onde as sequências foram analisadas quanto ao número de bases e as variações encontradas. Foram utilizados programas livres e de fácil utilização.

O potencial destes iniciadores na identificação de *Angiostrongylus* spp. foi analisado com o auxílio da ferramenta BLAST no GenBank e através da construção de matrizes de distância genética (p-distance), utilizando os programas MEGA, versão 7 e Excel 2016. Para essas análises também foram sequenciadas amostras das espécies *A. costaricensis* e *A. vasorum* e *Ae. abstrusus*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Verificação do pH das amostras

Com os procedimentos adotados para o preparo das amostras, que incluiu o ajuste do pH e a triagem das larvas, foi possível neutralizar o pH da amostra, eliminar as partículas visíveis na lupa e, ainda, restringir o volume de líquido aspirado durante o processo de triagem das larvas.

Quanto aos testes relacionados ao pH das amostras foi constatado que o produto da digestão artificial é ácido (pH $2,79 \pm 0,41$), conforme o esperado, justificando a necessidade de neutralização das amostras.

Os resultados da neutralização das amostras para a PCR mostraram que após uma única lavagem com PBS 1X o produto da digestão artificial torna-se neutro (pH $7,29 \pm 0,4$). Os valores de todas as medições de pH estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Determinação do pH de amostras de digestão artificial não neutralizadas e após neutralização com solução salina tamponada (PBS 1X).

Número da amostra	Não neutralizado	1ª. lavagem	2ª. lavagem	3ª. lavagem	PBS 1x
1	3,90	7,50	7,60	7,50	7,50
2	2,60	7,50	7,60	7,60	7,60
3	2,30	7,40	7,50	7,60	7,50
4	2,70	7,30	7,40	7,70	8,10
5	2,70	7,10	7,40	7,70	8,10
6	2,80	7,30	7,50	7,80	8,10
7	2,70	7,20	7,40	7,70	8,00
8	2,70	7,20	7,50	7,80	8,10
9	2,80	7,20	7,60	7,80	8,10
10	2,70	7,20	7,30	7,50	8,10
Média	2,79	7,29	7,48	7,67	7,92
Desvio Padrão	0,41	0,14	0,06	0,06	0,06

O uso de PBS para a neutralização de nematódeos que se encontravam envoltos pelo tecido do hospedeiro e imersos em solução de HCl, para posterior diagnóstico por PCR, também foi empregado com sucesso nos procedimentos realizados por Pozio e La Rosa (2003). É importante ressaltar que estes autores também tiveram o cuidado de evitar que fragmentos de tecido do hospedeiro fossem aspirados juntamente com as larvas. Esse cuidado é crucial já que amostras contendo quantidades elevadas de tecido do molusco podem, não só amplificar o DNA desse hospedeiro, como prejudicar a PCR, uma vez que moluscos são ricos em polissacarídeos, que podem inibir reações enzimáticas (Arseneau et al., 2017). Bessetti (2007) também apontou os polissacarídeos como inibidores que podem inviabilizar a amplificação, destacando a importância do tratamento dos fatores que podem inibir a ação da Taq.

4.2 Avaliação da influência do preparo das amostras na eficiência da PCR

Todas as dez amostras neutralizadas com PBS 1X foram amplificadas com sucesso, enquanto apenas duas das 10 amostras não neutralizadas amplificaram (canaletas 2 e 3 do gel inferior). Além disto, a intensidade das bandas no gel foi mais forte nas amostras neutralizadas, conforme demonstrado na Figura 1.

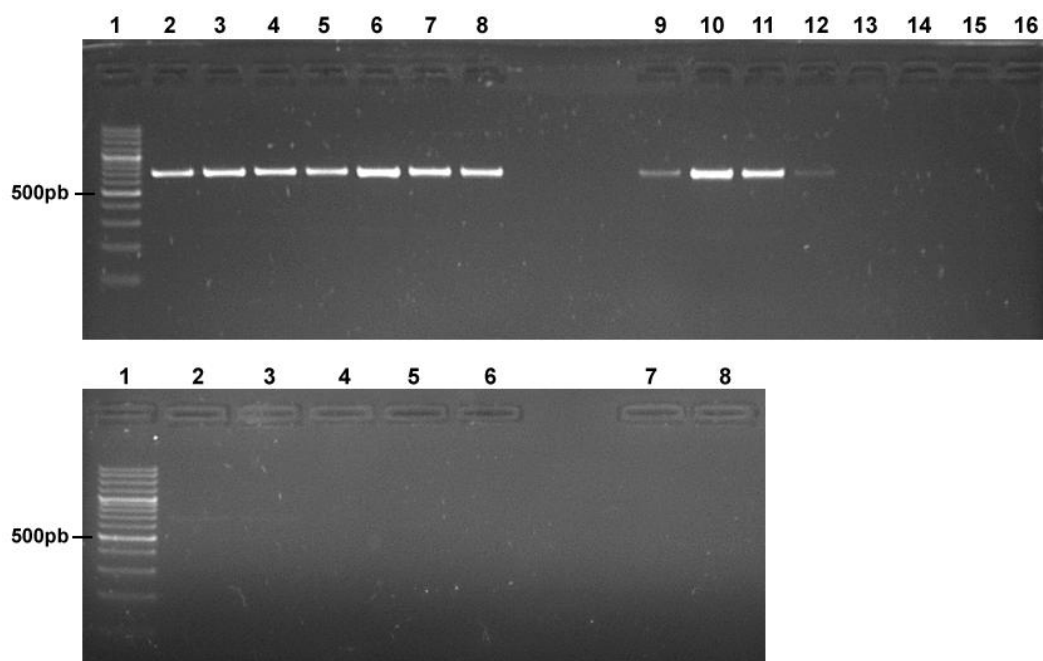


Figura 1- Géis resultantes dos testes de neutralização do pH das amostras de *A. cantonesis*. Gel superior: canaleta 1) marcador de peso molecular, 2 a 11) amostras lavadas com PBS 1X, 12) controle positivo, 13) controle negativo, 14 a 16) amostras não neutralizadas. Gel inferior: canaleta 1) marcador de peso molecular, 2 a 8) amostras não neutralizadas.

É importante ressaltar que estas amostras foram amplificadas com os mesmos reagentes, ao mesmo tempo e no mesmo termociclador. Estes resultados comprovaram, portanto, a eficácia da neutralização do pH na taxa de sucesso das reações de PCR, uma vez que os ácidos nucleicos sofrem hidrólise sob condições ácidas e quanto mais baixo o pH mais facilmente são hidrolisados (Oxford Gene Technology, 2018), apontando a importância do preparo adequado das amostras antes da amplificação.

A influência do preparo adequado das amostras para diagnóstico de patógenos por PCR também foi demonstrada por Lachaud et al. (2001) e Hoorfar et al. (2004), tendo sido considerada uma etapa fundamental para a eficiência das reações.

4.3 Teste de diferentes métodos de extração de DNA

4.3.1 Métodos de extração – Piloto 1

A presença de contaminantes foi alta em todos os métodos testados no Piloto 1, onde a relação da absorbância em 260/230nm ficou abaixo do limite inferior desejável (1,8) em todas as amostras (Tabela 2). De acordo com Matlock (2015), valores A260/280 e A260/230nm maiores que 1,8 são normalmente adequados para análise, visto que os valores mais baixos de A260/280 podem indicar contaminação de proteínas e valores mais baixos de A260/230 indicam contaminação com sais ou solventes.

Dentre os métodos de extração testados, o que empregou apenas o método físico de lise com pérolas de zircônio, associado à digestão com proteinase K (Protocolo 3A) apresentou a mais alta concentração de DNA (142,2ng/ul). No entanto, os resultados em relação à absorbância foram os piores (Tabela 2), indicando presença excessiva de contaminantes. Tal fato, associado à ausência de amplificação por PCR (Figura 2), leva-nos a inferir que a alta concentração de DNA observada pode ter sido ocasionada por um erro de leitura, uma vez que amostras contaminadas podem causar equívocos na leitura por espectrometria levando a resultados superdimensionados quanto à concentração de DNA (Oxford Gene Technology, 2018).

Nos demais métodos testados a presença de contaminantes foi menor, mas ainda alta e longe da faixa ideal. Apesar da presença expressiva de contaminantes, as amostras extraídas com os protocolos envolvendo apenas o choque térmico (Protocolo 1), choque térmico seguido de kit, com 4 horas de incubação (Protocolo 2) e somente kit, também com 4 horas de incubação (Protocolo 3), apresentaram taxa de amplificação de 100%. No entanto, quando visualizadas em gel, as amostras extraídas pelo Protocolo 1 apresentaram bandas mais fracas, enquanto naquelas em que se utilizou kit as bandas se mostraram mais intensas (Figura 2).

Quanto ao tempo de execução, o método de choque térmico com nitrogênio líquido (Protocolo 1) foi o mais rápido (1h 30 min) e, ainda, não gerou qualquer resíduo químico, sendo estas as suas principais vantagens em relação aos demais métodos testados (Tabela 2).

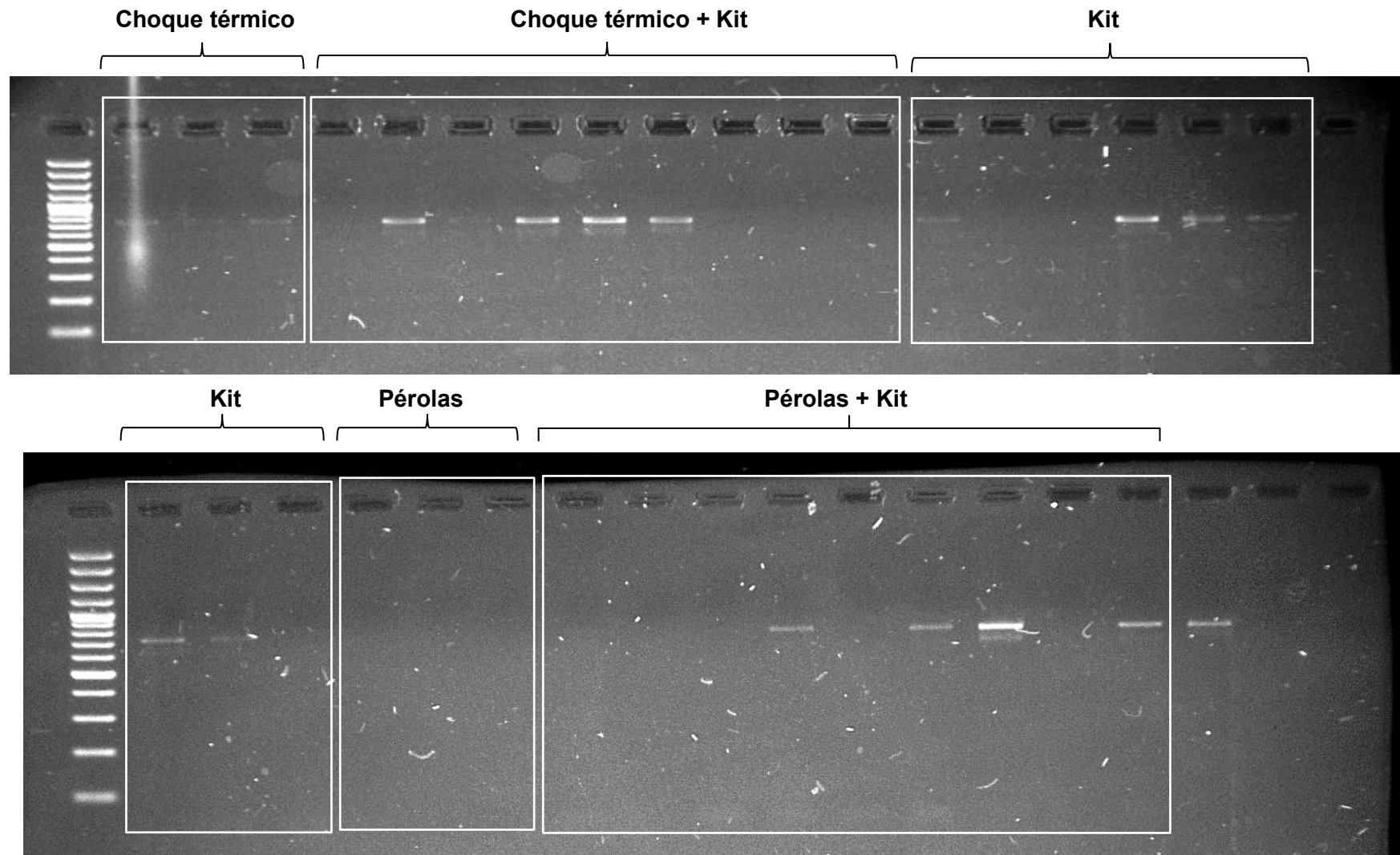


Figura 2. Géis (agarose 1,5%) dos protocolos de extração realizados no Piloto 1. Para cada método foram testadas 3 amostras, contendo 10 larvas L3 de *A. costaricensis* cada. PCR realizada com o iniciador de Prosser et al. 2013 modificado, nas mesmas condições descritas no item 3.4. Gel superior = última canaleta vazia; Gel inferior: 3 últimas canaletas = controle positivo, controle negativo e vazia.

Tabela 2. Resultado da quantificação por espectrometria dos métodos de extração testados no Piloto 1, com os tempos de execução de cada protocolo.

(ON = Overnight)

Método	Protocolo 1 Nitrogênio líquido	Protocolo 2 Kit									Protocolo 3 Pérolas	Protocolo 4 Nitrogênio líquido + kit									Protocolo 5 Pérolas + kit										
TEMPO DE INCUBAÇÃO	--	A = Incubação 1h			B = Incubação 4h			C = Incubação ON			--	A = Incubação 1h			B = Incubação 4h			C = Incubação ON			A = Incubação 1h			B = Incubação 4h			C = Incubação ON				
AMOSTRA	1.1 1.2 1.3	3A1 3A2 3A3	3B1 3B2 3B3	3C1 3C2 3C3	4.1 4.2 4.3	2A1 2A2 2A3	2B1 2B2 2B3	2C1 2C2 2C3	5A1 5A2 5A3	5B1 5B2 5B3	5C1 5C2 5C3																				
[] ng/ul	6,3 5 6,3	9,8 9,4 12,3	8,4 8,1 8,2	8 7,8 7,8	121,9 124 181,8	7,5 8,1 8,6	8,6 8,5 7,7	7,6 5,8 --	14,8 19 12,2	17,2 25 12,4	6 6,3 7,8																				
260/280	1,84 2,35 1,89	1,59 2,25 1,67	1,83 2,05 1,7	2,07 1,63 1,87	0,61 0,62 0,61	1,76 1,88 1,63	1,61 1,75 1,55	1,71 2,92 --	1,85 1,58 1,71	1,83 1,83 1,82	1,93 2,16 2,23																				
260/230	0,4 0,48 0,59	0,18 0,18 0,18	0,16 0,16 0,17	0,18 0,21 0,16	0,16 0,17 0,21	0,16 0,19 0,21	0,2 0,19 0,2	0,19 0,09 --	0,14 0,17 0,19	0,16 0,18 0,16	0,17 0,16 0,12																				
TEMPO DE EXECUÇÃO	1h 30m	2h 30m			5h 30m			21h 30m			5h 30m			3h 30h			6h 30m			22h 30m			3h 30m			8h 30m			24h 30m		

4.3.2 Métodos de extração – Piloto 2

Quanto ao Piloto 2, os valores resultantes da espectrometria das amostras obtidas foram bastante divergentes, havendo a necessidade de realizar diversas mensurações da mesma amostra. Assim, foi calculada a média das medições, onde foram retirados os *outliers* e consideradas, no mínimo, três medições de cada amostra (Tabela 3). Os dados brutos considerados nesta análise estão disponíveis nos Anexos (item 7.5), onde: 260/280 = razão entre ácidos nucléicos e proteínas e 260/230 = razão entre ácidos nucléicos e outros contaminantes.

Tabela 3. Média de ácidos nucléicos dos protocolos realizados no Piloto 2, conforme a quantificação por espectrometria (NanoDrop).

Protocolos de Extração	Média de Ácidos Nucléicos (ng/μL)
1	102,10
2	32,45
3A	221,30
3B	154,50
6	35,30
7A	226,50
7B	157,90
7C	168,80
8A	9,40
8B	8,42
8C	3,70

Os protocolos que haviam sido realizados no primeiro piloto e foram repetidos, apresentaram maiores quantidades de ácidos nucléicos nesse teste. Embora não tenha sido utilizado o mesmo equipamento do Piloto 1, a presença de contaminantes permaneceu fora da faixa ideal em todas as amostras, independentemente do método. Quanto aos novos protocolos testados, aqueles envolvendo o uso de SDS (Protocolos 8A, 8B, 8C) apresentaram os piores resultados quanto à quantidade de ácidos nucléicos recuperada e os de lise mecânica com miçangas seguida de choque térmico (Protocolos 7A, 7B, 7C), os melhores (Tabela 3).

Métodos mais artesanais tem se mostrado capazes de extrair DNA com boa qualidade. Um estudo realizado por Mega & Revers (2011) demonstrou, através de uma análise por espectrometria, a obtenção de uma maior quantidade de DNA, sem perda na pureza das amostras, utilizando-se um método de extração artesanal em comparação a outros dois com o uso de kits comerciais. No entanto, estes autores utilizaram um método contendo mais etapas e mais reagentes em relação aos protocolos, sem uso de kit, aqui realizados e, além disso, utilizaram reagentes tóxicos, como o clorofórmio. No presente trabalho, foram priorizados métodos de fácil execução, com poucas etapas, e que exigiam poucos recursos e infraestrutura relativamente simples.

Tabela 4- Resultado da quantificações de DNA por fluorimetria (Qubit), nas amostras do Piloto 2.

Método de extração	Qubit - DNA ng/μl
Protocolo 1	0,146 0,177
Protocolo 2	0,158 0,171
Protocolo 3A	0,020
Protocolo 3B	0,020
Protocolo 6	0,260 0,358
Protocolo 7A	0,013
Protocolo 7B	0,022
Protocolo 7C	0,124
Protocolo 8A	0,031 0,021
Protocolo 8B	0,031 0,048
Protocolo 8C	0,017 too low

Os resultados da quantificação por fluorimetria, exibidos na Tabela 4, mostraram que os protocolos de extração cujas amostras apresentaram as maiores

quantidades de DNA foram aqueles com choque térmico (Protocolos 1 e 6) e com o uso de kit comercial (Protocolo 2). Papayiannis et al. (2013) compararam quatro métodos de extração de DNA, quantificados por fluorimetria com o uso do Qubit, e também verificaram bons resultados para as amostras extraídas com kits comerciais que continham etapas de centrifugação em colunas de sílica. Este componente, conforme demonstrado por Caldart et al. (2011), apresenta afinidade com as moléculas DNA, proporcionando recuperar mais DNA e menos inibidores.

As amostras de DNA geradas a partir dos protocolos aqui testados (Protocolos 1 a 8), quando quantificadas por espectrofotômetro para microvolumes (NanoDrop), apresentaram valores entre absorbâncias que indicam um baixo grau de pureza. A grande diferença encontrada entre os valores de DNA fornecidos pela técnica de espectrometria em relação àqueles fornecidos na quantificação por fluorimetria, sugere que ambos os ácidos nucleicos, além de outros contaminantes, podem ter sido considerados na contagem, uma vez que a detecção de DNA e de RNA por espectrometria se dar no mesmo comprimento de onda. Nesse contexto, Hussing e colaboradores (2015) discorreram sobre a superioridade da leitura por fluorimetria, que contabiliza apenas o DNA (Qubit), sobre aquela realizada por absorbância de luz (espectrofotômetro NanoDrop), destacando que nesta última outras moléculas, como proteínas e RNA, podem ser consideradas na leitura de ácidos nucleicos.

Outra desvantagem observada durante a análise das amostras por espectrometria foi a variação, às vezes bem grande, entre uma leitura e outra da mesma amostra, o que não ocorreu na leitura por fluorimetria. Por essa razão, somente os resultados das quantificações com esta técnica foram considerados para a escolha dos protocolos de extração a serem analisados até a etapa de sequenciamento de DNA e com maior número de réplicas por amostra.

Quanto à avaliação pelo resultado das PCR com cada protocolo de extração, aqueles envolvendo lise mecânica com pérolas de zircônio e miçangas (Protocolos 3 e 7) não resultaram em boas amplificações, tendo sido observadas bandas muito fracas. Dentre as variações do método utilizando miçangas, o protocolo realizado com o uso de três miçangas (Protocolo 7A) foi o que apresentou uma banda um pouco mais intensa, conforme exibido na Figura 3.

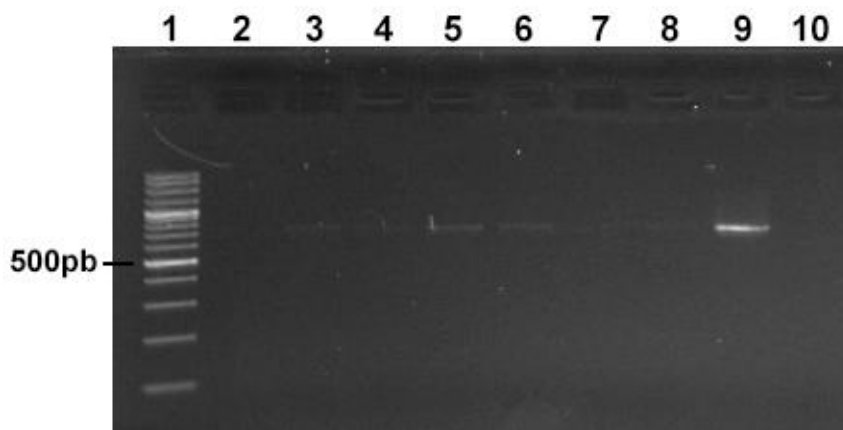


Figura 3. Gel da PCR dos protocolos com lise mecânica por pérolas de zircônio e miçangas (Piloto 2), com amostras de *A. cantonensis*, 10 L3 cada. Canaletas: 1) marcador de peso molecular; 2, 3 e 4) Protocolo 3; 5 e 6) Protocolo 7A; 7 e 8) Protocolo 7B; 9) controle positivo; 10) controle negativo.

A escolha das pérolas de zircônio para realizar uma lise mecânica anterior à extração de DNA foi baseada no artigo de Crowder et al. (2010), no qual essas pérolas foram utilizadas com sucesso para a extração do DNA total de vírus e bactérias patogênicas em carrapatos. Sua utilização neste projeto partiu da premissa de que através da ruptura prévia da cutícula protetora presente nos nematódeos uma maior quantidade de DNA pudesse ser obtida.

Os métodos de extração por choque térmico em nitrogênio líquido e em freezer (Protocolos 1 e 6), tiveram a mesma taxa de sucesso quanto à amplificação das amostras e apresentaram pouca diferença quanto à intensidade da banda no gel (Figura 4).

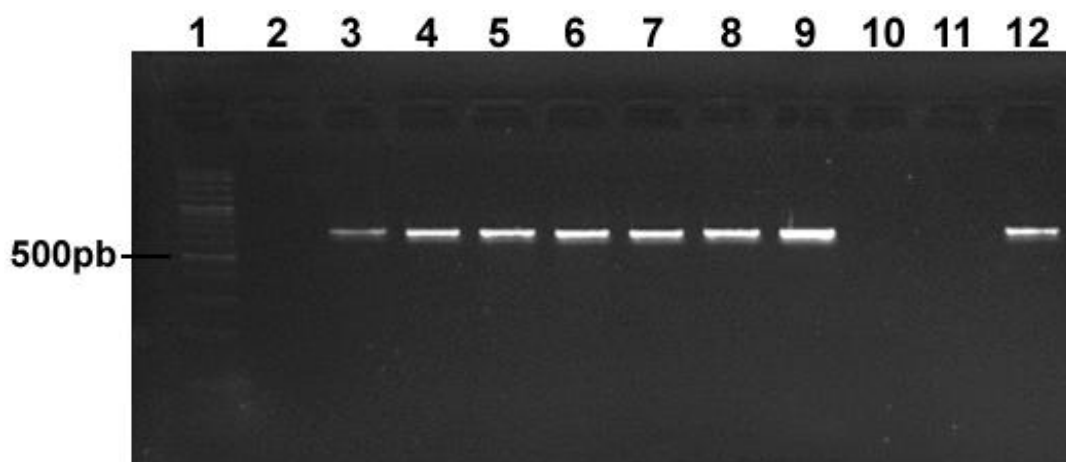


Figura 4. Gel, agarose 1,5%, da PCR dos protocolos com choque térmico, com amostras de *A. cantonensis*. Canaletas: 1) marcador de peso molecular; 2) vazia; 3*, 4 e 5) Protocolo 6 (freezer); 6, 7 e 8) Protocolo 1 (nitrogênio); 9) controle positivo; 10) controle negativo; 11) vazia; 12) Protocolo 6, amostra da canaleta 3 reaplicada. * parte da amostra vazou durante a aplicação.

A adoção de um protocolo utilizando SDS (Protocolo 8), conforme o método descrito em Margam et. al. (2010), foi baseada na possibilidade deste atuar como uma alternativa mais barata ao uso de kits comerciais de extração de DNA de tecido animal. No entanto, os resultados dos testes realizados com esse método, isolado ou combinado com outros protocolos (Figura 5) mostraram que as extrações com kit e com choque térmico foram mais eficazes tanto quanto ao sucesso da amplificação como quanto à quantidade de DNA obtida (intensidade das bandas).

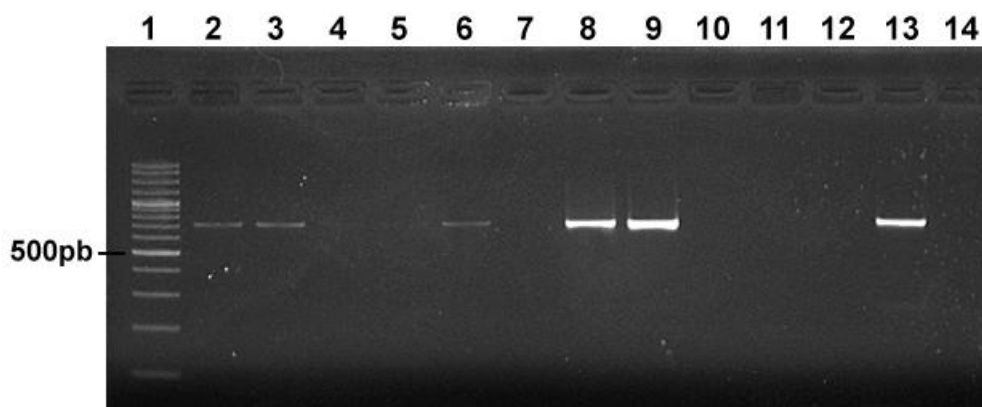


Figura 5. Gel da PCR com o Protocolo 8, com amostras de *A. cantonensis*. Canaletas: 1) marcador de peso molecular; canaletas 2 e 3) Protocolo 8A; 4 e 5) Protocolo 8B; 6 e 7) Protocolo 8C; 8 e 9) Protocolo 2 (kit) e canaleta 13) controle positivo, extraído com nitrogênio (Protocolo 1).

4.3.3 Métodos de extração selecionados para o sequenciamento (teste final):

Foram selecionados três protocolos para o teste final, ou seja, cujas amostras obtidas com cada protocolo de extração foram levadas até a etapa de sequenciamento de Sanger. Esses protocolos estiveram representados por dois métodos de extração por choque térmico (Protocolos 1 e 6) e pelo método com o uso de kit comercial (Protocolo 2), com 4 horas de incubação. A escolha deste último levou em consideração a quantidade e qualidade do DNA obtido, conforme demonstrado nos dois pilotos realizados. Já a escolha dos métodos de resfriamento com nitrogênio líquido (Protocolo 1) e de resfriamento no freezer (Protocolo 6), foi decorrente da facilidade de execução (menor número de etapas), da menor geração de resíduo e do custo final da extração, tendo em vista o alto valor comercial dos kits de extração de tecido animal disponíveis no mercado.

Um esquema dos pilotos realizados, desde a execução dos primeiros protocolos de extração de DNA testados até a seleção para o teste final, é mostrado na Figura 6 .

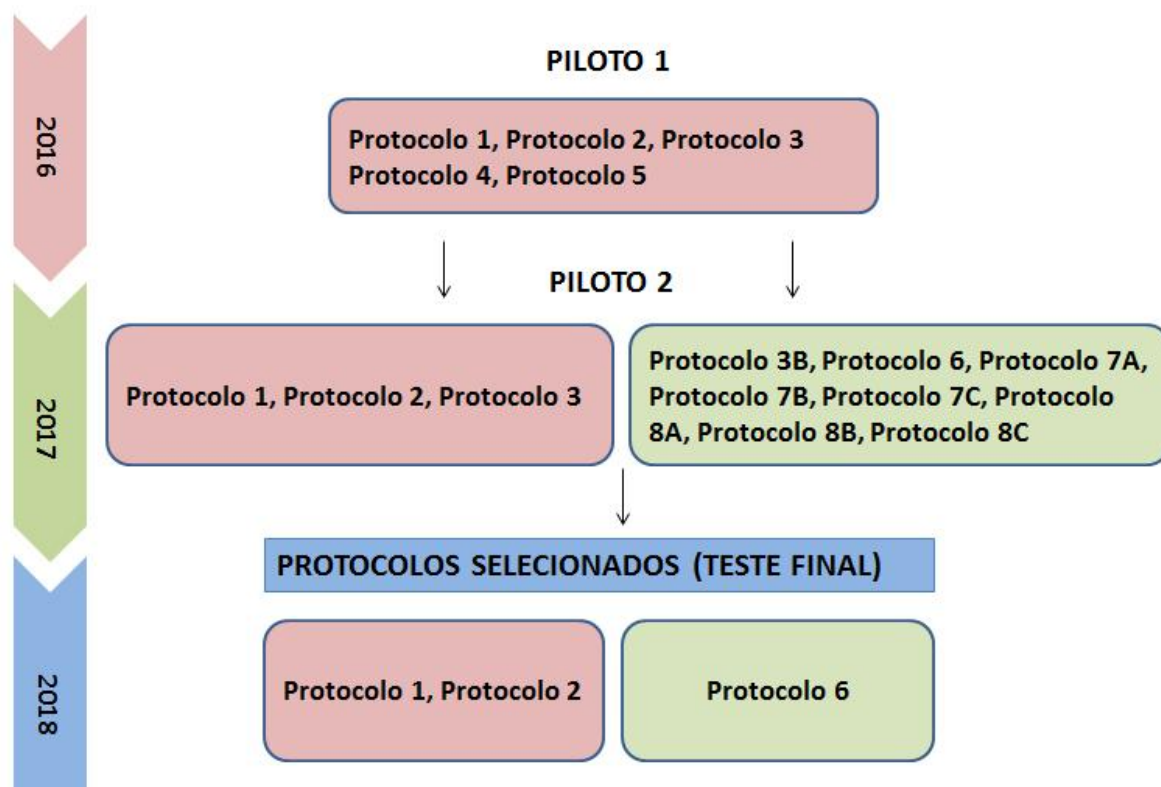


Figura 6 – Fluxograma dos protocolos de extração testados nos Pilotos 1 e 2, e dos protocolos selecionados a partir destes pilotos para o teste final.

As amostras obtidas a partir dos protocolos de extração realizados nesse teste final foram, inicialmente, analisadas quanto à quantificação de DNA, por fluorimetria (Qubit), cujos resultados são exibidos na Tabela 5. Nota-se que, mais uma vez, as extrações com kit comercial (Protocolo 2) se destacaram quanto à pureza do DNA obtido. Este protocolo também foi o que apresentou a menor variação entre as amostras, conforme evidenciado pelo menor valor de desvio padrão exibido (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultado da quantificação por fluorimetria, com Qubit, dos protocolos de extração testados até a etapa de sequenciamento de Sanger (amostras do teste final).

Método de Extração	Resultado (DNA ng/uL)	Média e Desvio Padrão por Método
Kit (Protocolo 2) n = 10	0,11	0,13±0,03
	0,11	
	0,16	
	0,19	
	0,13	
	0,17	
	0,11	
	0,16	
	0,13	
	0,08	
Freezer (Protocolo 6) n = 10	0,24	0,09±0,09
	Too low	
	0,04	
	Too low	
	0,14	
	0,01	
	0,18	
	0,03	
	0,02	
	0,03	
Nitrogênio Líquido (Protocolo 1) n = 10	0,02	0,05±0,04
	0,03	
	0,02	
	0,02	
	0,04	
	0,05	
	0,15	
	0,04	
	0,06	
	0,05	

Entre os protocolos de extração de DNA por choque térmico (Protocolos 6 e 1, respectivamente), aquele com resfriamento em freezer resultou em um maior número de amostras com menor concentração de DNA.

Apesar de apresentar uma execução mais simples e segura, o Protocolo 6 (freezer) foi um pouco mais demorado (tempo de execução de 2h) do que o Protocolo 1 (nitrogênio líquido).

O resultado das amplificações dos três protocolos do teste final, todas utilizando os iniciadores Prosser-Modificado, demonstraram que o protocolo com kit

foi o único a apresentar 100% de eficiência para todas as amostras testadas, enquanto aqueles envolvendo choque térmico apresentaram taxa de amplificação de 90%, igualmente. O resultado de uma reação de PCR envolvendo os três protocolos simultaneamente e utilizando a mesma espécie, *A. cantonensis*, é exibido na Figura 7.

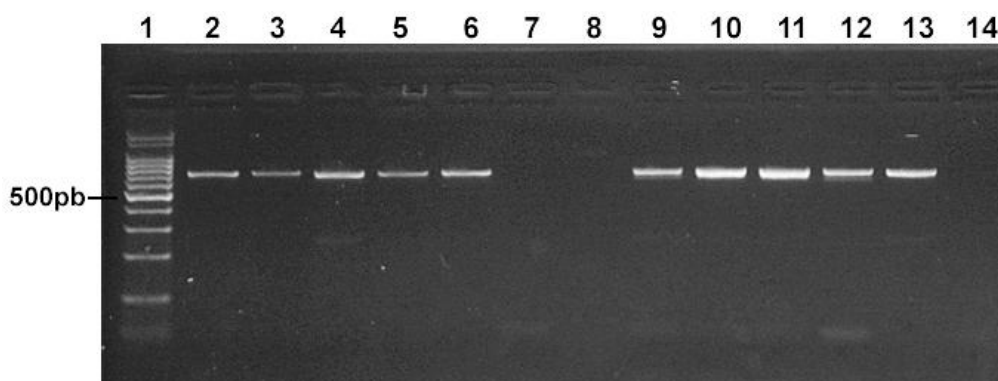


Figura 7. Gel de agarose 1,5% da PCR comparativa de amostras de *A. cantonensis* (10 L3 cada) extraídas conforme os Protocolos de extração 1, 2 e 6.

Canaletas: 1) marcador de peso molecular; 2, 3 e 4) Protocolo 6 (freezer); 5 e 6) Protocolo 1 (nitrogênio); 7) controle negativo; 8) vazia; 9 a 12) Protocolo 2 (kit); 13) controle positivo extraído com Protocolo 1; 14) controle negativo.

Foi realizada ainda uma PCR para comparar somente as amostras extraídas pelos protocolos de choque térmico, com a mesma massa de DNA inicial (0,04 ng/uL). Este resultado não demonstrou diferença quanto à eficiência de amplificação entre cada técnica (Figura 9).

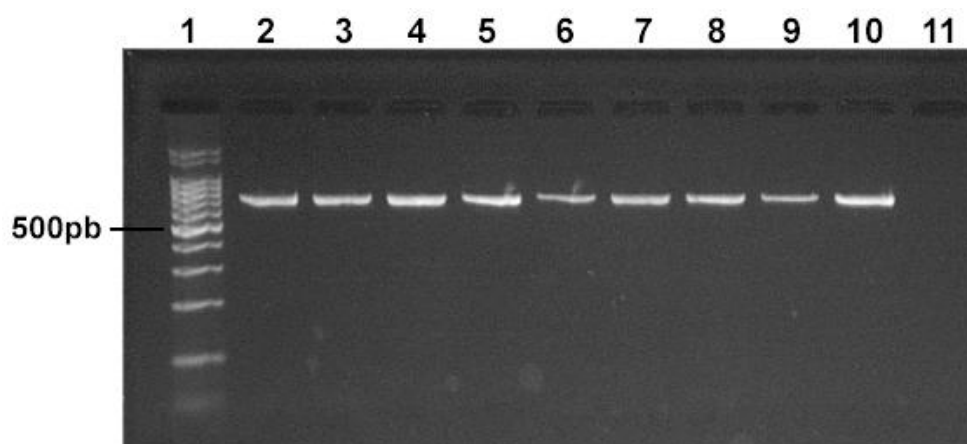


Figura 8. Gel (agarose 1,5%) comparativo de amostras de *A. cantonensis* extraídas com choque térmico, contendo a mesma concentração de DNA inicial (0,04 ng/uL). Canaletas: 1) marcador de peso molecular; 2 a 5) amostras extraídas com nitrogênio; 6 a 9) amostras extraídas com freezer; 10) controle positivo, extraído com nitrogênio; 11) controle negativo.

Dentre o total de amostras extraídas com os protocolos executados no teste final, aquelas com o uso de kit se destacaram, mais uma vez, apresentando 100% de amplificação independente da espécie utilizada (Figura 9).

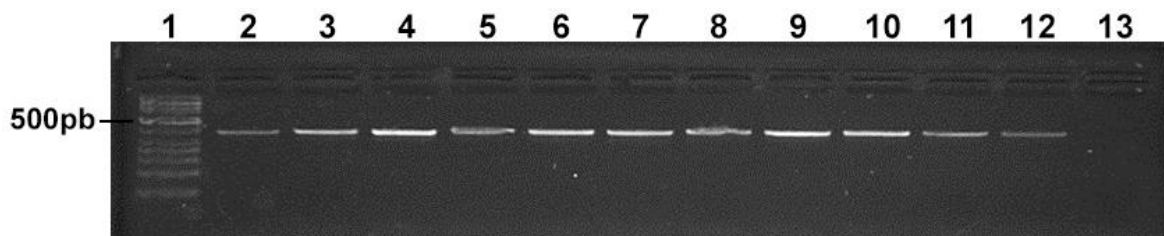


Figura 9. Amostras de *A. cantonensis* (canaletas 2 a 5), *A. costaricensis* (canaletas 6 a 8) e *A. vasorum* (canaletas 9 a 11) extraídas com kit comercial e controle positivo de *A. cantonensis* extraído com nitrogênio (canaleta 12).

Quanto aos resultados do sequenciamento das amostras extraídas pelos protocolos executados no teste final (Tabela 6), observou-se que:

Protocolo 2 (extrações com kit): das 10 amostras enviadas para sequenciamento, 17 sequências apresentaram boa qualidade, com apenas três sequências de baixa qualidade (*A. cantonensis* 01 R, *A. cantonensis* 04 F, *A. cantonensis* 05 F). Destas, oito foram sequências *forward* e nove sequências *reverse*. As 17 sequências obtidas apresentaram mais de 600 pares de bases (635-653), tendo em comum um total de 613pb.

Protocolo 6 (extrações com freezer): foi obtido um total de 17 sequências de boa qualidade e três sequências de baixa qualidade (*A. vasorum* 15 F, *A. vasorum* 16 F, *A. cantonensis* 20 R). Deste total, oito sequências *forward* variaram de 495 a 641 pares de bases, após edição. Quatro delas apresentaram mais que 600 pares de bases (641, 632, 632, 603 pb), duas outras entre 500-600 pares de bases (568, 562 pb) e duas entre 400-500 pb (449, 495). Dentre as nove sequências *reverse* obtidas, que na grande maioria apresentaram entre 500-600 pares de bases (520, 571, 573, 574, 574, 574, 577), duas apresentaram mais que de 600pb (621, 624 pb). A parte comum entre as sequências *forward* e *reverse* apresentou 302 pares de bases. Houve, portanto, uma variação maior quanto ao tamanho do fragmento amplificado, em relação ao protocolo com kit comercial.

Protocolo 1 (extrações com nitrogênio líquido): foram obtidas oito sequências *forward* e dez sequências *reverse* com sucesso. As sequências de baixa qualidade foram: *A. cantonensis* 6 F e *A. costaricensis* 8 F. Após a edição, as sequências *forward* variaram de tamanho (de 445 a 649 pares de bases), onde a maioria apresentou entre 500-600 pares de bases (522, 530, 530, 568, 568, 573, 639). Já as sequências *reverse*, todas obtidas com sucesso, variaram de 455 a 649 pares de bases. A maioria teve entre 500-600 pares de bases. Outras três tiveram acima de 600 pares de bases (605, 620, 649), com uma única sequência mais curta (455 pares de bases). Em relação aos demais protocolos, houve uma sequência de boa qualidade a mais recuperada com este protocolo.

Um sumário da análise comparativa das sequências geradas a partir de DNA extraído com os três diferentes métodos é apresentado a seguir (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado do sequenciamento do gene COI, utilizando os iniciadores de Prosser et al. (2013) modificados a partir de DNA obtido com três diferentes métodos de extração: com kit comercial, por choque térmico com a utilização de Nitrogênio Líquido e por choque térmico com a utilização de Freezer.

Método	Sequências obtidas com sucesso	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	N° de pares de bases amplificado*	Tamanho das sequências (pares de bases)			Tamanho da parte comum a todas as sequências obtidas*
					> de 600	500 -600	400-500	
Kit comercial Qiagen	17	8	9	635-653 pb	17	0	0	613 pb
Choque térmico Freezer	17	8	9	449-641 pb	6	9	2	302 pb
Choque térmico Nitrogênio Líquido	18	8	10	445-649 pb	4	12	2	386 pb

*Para a verificação do tamanho da parte comum a todas as sequências obtidas, não foram consideradas as sequências abaixo de 500 pb. O número de sequências obtidas com sucesso inclui as fitas *forward* e *reverse* de cada amostra, separadamente.

Apesar de ter havido sequências com qualidade ruim, todas as amostras geradas a partir do DNA extraído com os três protocolos selecionados possibilitaram o diagnóstico molecular das espécies alvo deste estudo, pois as fitas complementares foram amplificadas com sucesso.

O protocolo de extração com kit comercial foi o que resultou em um DNA mais puro, pois inclui etapas de lavagem com detergentes e centrifugação em colunas com resina de sílica, que retiram mais contaminantes da amostra. O sucesso dessa

metodologia já era esperado, uma vez que a presença de contaminantes decorrentes do processo de extração pode inibir completamente a ação da enzima *Taq* polimerase, inviabilizando o diagnóstico (Al-Soud e Radström, 1998; Silva, 2010). Embora o método com Nitrogênio tenha resgatado uma maior quantidade de sequências de boa qualidade, o tamanho dos fragmentos obtidos com kit foi bastante superior (>60%). No entanto, esta metodologia de extração de DNA é muito mais cara.

Entre os métodos de extração de DNA por choque térmico, as técnicas empregando o uso de Freezer e Nitrogênio Líquido obtiveram o mesmo êxito na amplificação. Porém, o método com Nitrogênio resgatou uma maior quantidade de DNA e de sequências de boa qualidade. Por outro lado, o método utilizando Freezer foi o de menor custo e não resultou na geração de resíduos químicos.

Existe uma grande diversidade de métodos para extração de DNA, desde protocolos artesanais, até kits comerciais extremamente elaborados (Bonin et al. 2010). A compreensão dos fatores envolvidos direta ou indiretamente no processo de extração é fundamental para o resultado do processo, pois a extração de DNA é uma etapa que tem enorme influência sobre o sucesso da amplificação e consequentemente na identificação molecular (Rådström *et al.* 2004; Scorsato e Telles, 2001). Nesse contexto, devem-se em conta ainda as características do organismo alvo. Zeng e colaboradores (2013) reportaram que larvas L3 da espécie *A. cantonensis* podem apresentar até duas cutículas, se obtidas durante a ecdise.

Considerando a qualidade dos resultados obtidos pela extração com kit, este método foi escolhido para os testes de comparação da eficiência dos iniciadores.

4.4 Seleção dos iniciadores para a identificação de *Angiostrongylus* spp.

A seleção dos iniciadores para este trabalho levou em consideração os resultados alcançados em testes anteriores, realizados pelo LRNEM-IOC, entre 2011 e 2015, com iniciadores já descritos na literatura, conforme sumarizado no Quadro 2.

Apesar dos iniciadores descritos em Bowles et al. (1992) terem sido eficientes para a identificação das espécies de *Angiostrongylus* (Monte et al., 2012), eles mostraram-se pouco eficientes para o diagnóstico de larvas, mesmo após a aplicação dos processos de neutralização e triagem propostos neste trabalho. Vale ressaltar que Monte et al. (2012) utilizaram parasitas adultos que, além de serem maiores e terem mais DNA, foram obtidos diretamente do hospedeiro definitivo através de necropsia, portanto, sem a etapa de digestão artificial molusco.

Outros iniciadores descritos na literatura, como o coquetel proposto em Prosser et al. (2013), composto por três pares de iniciadores, também foram testados. Estes iniciadores, por sua vez, foram desenhados com base em sequências de nematódeos que representaram o Filo Nematoda como um todo, tendo como pressuposto englobar toda variação dentro de Nematoda. Por isso, contêm várias bases degeneradas que, devido ao grande número de possibilidades de ligação, formaram muitos dímeros (*primer dimer*) na reação, resultaram em sequências de baixa qualidade.

Os iniciadores descritos por Folmer et al. (1994), embora comumente utilizados para o sequenciamento de metazoários e com diversas sequências de *Angiostrongylus* spp. depositadas no GenBank, também não apresentaram bons resultados nos testes realizados para o diagnóstico de larvas. Prosser et al. (2013) compararam o coquetel de iniciadores proposto em seu trabalho com os descritos por Folmer et al. (1994) e demonstraram praticamente a mesma eficiência na amplificação (87% e 89%, respectivamente). No entanto, a quantidade e o tamanho das sequências recuperadas foram significativamente maiores com os iniciadores do coquetel de Prosser et al. (2013). Apesar desta análise ter sido realizada com 95 amostras de nematódeos, estes iniciadores não chegaram a ser testados para espécies do gênero *Angiostrongylus*.

Embora ineficazes para a amplificação das larvas, os iniciadores previamente testados pelo LRNEM fomentaram o desenho dos iniciadores desenvolvidos neste trabalho (item 4.5).

4.5 Desenvolvimento de novos iniciadores

O resultado do sequenciamento da placa contendo 13 amostras de nematódeos, descrita no item 3.7, apontou uma melhor qualidade nas sequências obtidas de amostras amplificadas com os iniciadores Nem1_t1 e Nem3_t1, do coquetel proposto por Prosser et al. (2013), isoladamente. No entanto, a constante formação de dímeros durante as reações de amplificação permaneceu, trazendo a necessidade de realizar a purificação do produto da PCR a partir do gel de agarose. Assim, acrescentava etapas ao diagnóstico, tornando o processo de identificação molecular das larvas ainda mais demorado.

A partir das dificuldades relatadas, foi realizada uma análise das sequências do iniciador Nem3_t1 do coquetel proposto por Prosser et al. (2013), uma vez que o Nem1_t1 apresentava um maior número de bases degeneradas. Tal análise relevou a presença de regiões homólogas, conforme demonstrado na Figura 10.

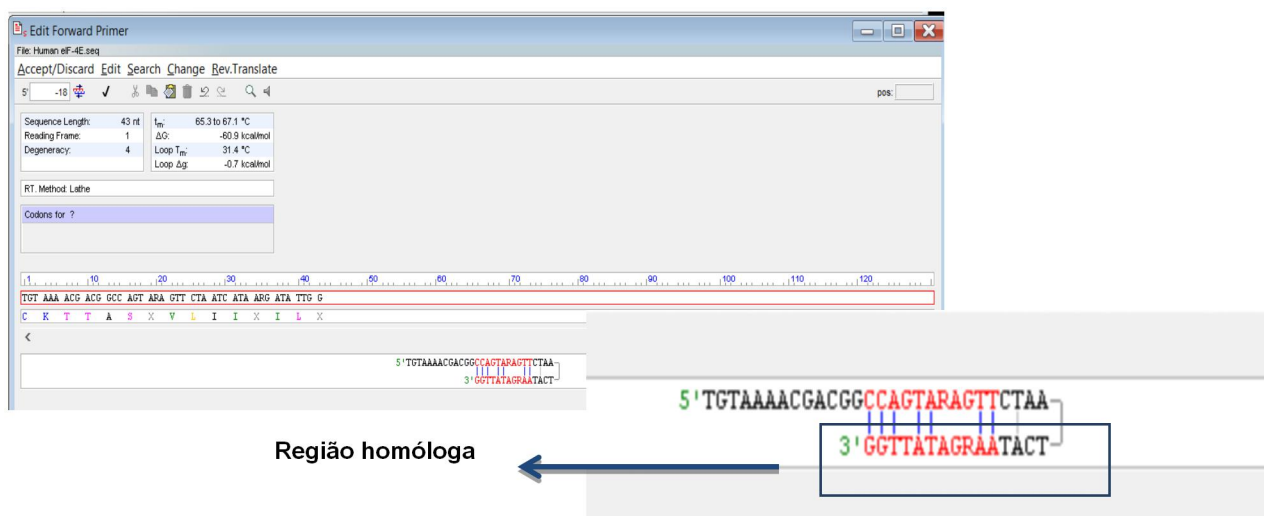


Figura 10. *Print screen* da tela do programa Oligo7, mostrando o auto-anelamento do iniciador de Prosser et al. (2013).

Dentro da proposta de um coquetel universal de iniciadores para nematódeos, Prosser et al. (2013) adicionaram uma terminação (M13) em todos os iniciadores e fizeram o amplo uso de bases degeneradas. No entanto, a finalidade do emprego dos iniciadores no presente trabalho é diferente daquele proposto por esses autores, uma vez que temos um grupo alvo bem definido: as espécies de *Angiostrongylus* de importância médica e veterinária. Desta forma, para o trabalho aqui desenvolvido,

não faria sentido utilizar vários pares de iniciadores, contendo várias bases degeneradas, na mesma reação, mas sim apenas aquele par de iniciadores que se mostrasse mais eficiente na amplificação do DNA das espécies alvo, substituindo as bases degeneradas quando possível. Assim sendo, a parte inicial da sequência relativa à terminação M13 foi retirada do iniciador *forward* do terceiro par (F3: **tgtaaacgacggccagt**ARAGTTCTAATCATAARGATATTGG). As bases degeneradas foram substituídas por aquelas encontradas naquela mesma posição nas espécies *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*. Além disso, as três últimas bases da região 3', considerada a mais crítica para auto-anelamento, também foi retirada. Dessa maneira, a sequência modificada ficou com a seguinte conformação: 5'AAAGTTCTAATCATAAGGATA 3'.

Para o iniciador *reverse*, não foram detectadas regiões homólogas, assim, as modificações realizadas foram somente a retirada da terminação M13 e a substituição de uma base degenerada, ficando: 5'AAACCTCTGGATGACCAAAAAATCA 3'.

O par de iniciadores proposto por Bowles et al. (1992), que amplifica outra região do COI de *Angiostrongylus* spp., foi modificado (Bowles-Modificado), com base na sequência do mitogenoma completo de *A. cantonensis* da China (NC013065). Nesse caso, o software utilizado indicou apenas pares de iniciadores que resultavam em um amplicon muito curto (~190pb). Assim, a sequência *forward* indicada pelo programa foi mantida e foi escolhida uma nova sequência *reverse*, que resultou em um amplicon de 413pb (Figura 11).

Além disso, um novo iniciador, que amplifica a mesma região que os iniciadores descritos em Prosser et al. (2013), foi desenhado (Iniciador-Novo) a partir dos mitogenomas completos das espécies *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum* (Figura 12).

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager Help
About Source Code

< Back

Pair 1:
 Left Primer 1: Primer_F
 Sequence: TGCCTGCCTTTGGGATTGTTA
 Start: 426 Length: 21 bp Tm: 62.7 °C GC: 42.9 % ANY: 2.0 SELF: 2.0
 Right Primer 1: Primer_R
 Sequence: AGCCCCCAACCTTAAAAACAT
 Start: 838 Length: 20 bp Tm: 59.7 °C GC: 45.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
 Product Size: 413 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0

Send to Primer3Manager | Reset Form

1	ACCAACTCG	ATGTTTTGA	TTTAGATTC	TTGTTTTGTG	GATATAGGAT
51	GTGGGACTAG	TTGGACTGTT	TATCCGCCTT	TGAGAAGTTT	AGTCACTCCT
101	GGTAGAAGGG	TGGATTGGC	GATTTTAGT	TTGCATTGTG	CTGGACTGAG
151	TTCTATTTTG	GGGGTATTA	ATTTATAGTG	TACAACGAG	AATATGCGAA
201	GAGTTCAT	TTCTTGGAA	CATAGAGTT	TGTGTGTGT	ATCTGTTTT
251	GTGACTGTTT	TTTGTGGT	GTGCTTTA	CCTGTGTGG	CCGGGCTAT
301	CACTATATA	TTAAGTGC	GTAAATTA	TACTCTTTT	TTGATCCTA
351	GTCTGGTGG	TAATCTTGG	ATTTATGGC	ATTGTTTTG	ATTTTGGT
401	CATCTGAGG	TTATGTTTT	GATTTGCOCT	GCTTTGGGA	TTGTTAGCA
451	GTCTACTTTA	TATTTAAGG	GTAAAAAGA	GGTTTTGGT	TATTTGGTA
501	TGTTTATGC	TATTTAAGA	ATTGGTTGA	TTGTTTGTG	GGTTGGGCT
551	CATCATATAT	ATAAGGTTG	TATGGATTGA	GATCTCTGTG	CTTATTTTAC
601	TGCGGCTACT	ATAGTTATG	CGGTCCTAC	GGGAGTGAAG	GTTTTAGGT
651	GGTTGGCAAC	TTTATTTGGT	ATAAAGATAI	TGTTCACCC	TATTTATG
701	TGGTTTTGG	GTTTTATTTT	TTTATTTACT	ATCGGTTGGT	TACGGGGGT
751	TATTTGGCT	AATCTAGTT	TGGATATTAT	TTTACATGAT	ACTTATATG
801	TGTTTGGCA	TTTTCTAT	GTTTTAGCT	TGGGGCT	GT
851	TTTACTGTA	TTAGTCTTG	ATGAGGTTT	ATGACTGTT	GTGTTATAA
901	TAGTTGTAT	ATAGTGTGA	TGTTTTTTT	GATGTTTTG	GGTGAATT
951	TGACTTTTT	TCCTTGAT	TTTGTGGT	TACATGGTA	TCCTCGTAA
1001	TATTTAGATT	ATCCTGATG	TTATTCAGT	TGAAATGTA	TTCTCTTT
1051	TGGTCTTA	ATTAGTGT	TTGCTTATT	TATATTATT	TTTTGTTG
1101	TGGAGCTTT	TTTTAGATAT	CGTTTGTG	TACAGGATA	TTATTATAA
1151	AGAAGTCC				

Figura 11. Print screen da tela do programa Primer3plus, mostrando o teste com os iniciadores Bowles-Modificado.

>CANTONENSIS|NC_013065_NC_013065_DNA_COI

7741.GAGTGAAATTTGATTGGAAGAAAAATCTCTTACATTTATATATAAGAAATATCAAGGTGGTTGTGGTTGATTAG **AAAGTCTAATCATA**
AGGATA TGGTACTCTTATTTTTGTTGGTTATGGTCGGGATGTTAGGTAAGTCTTATCTTTGATTGTCGTTTGGAAATGTCTAAGCCTGGAA
 TGTTGTTGCTAATGGCAATTGTATAATCAATTATTACGGCTCATGCTTTTTGATGATTTTTTTATGGTGATCGCTAGTATGATTGGTGGTTTTGG
 TAAT **TGAATATGCTTTGATGTTG**GGGGCTCCGGATATGAGTTTTCTCGTTTTGAATAATTTGAGTTTTGATTATTACCAACTCCGATTTTTGATT
 TTAGATCTTGTGTTTGGATATAGGATGTGGACTAGTTGGACTGTTATCCGCCCTTGGAGAAGTTAGGTCATCCTGGTAGAAGGGTGGATTTGG
 CGATTTTTAGTTGCAATGTGCTGGACTGAGTTCTATTTGGGGGATTAATTTATGTGTACAACGAAGAATATGCGAAGAAGTTCAATTTCTTTGG
 AACATATGAGTTTGTGTTGATCTGTTTTGACTGTTTTTTGGTGTGCTTTACCTGTGTTGGCCGGGCTATCACTATATTTAACTGA
 TCGTAATTTAAATACCTCTTT **TTTTGATCCTAGTCTGGTGG**TAATCCTTTGATTTATCGGCATTTGTTT **TGATTTTTGGTCATCCTGAGGTT**ATGTTT
 TGATTT **TCCTGCTTTGGGATTGTTA**GACAGTCACTTTATATTAACGGGTAAAAAGGTTTTGGTTATTTGGGTATGTTTATGCTATTTTAAAG
 AATTGGTTTGGTTGGTGTGGCTCATCATATATACGGTGGTATGGAATTTAGATTCTCGTCTATTTTACTGCGGCTACTATAGTTAT
 TGCGTTCCTACGGGAGTGAAGTTTTAGTGGTTGGCAACTTTATTTGGTATAAGATATTGTTTCAACCTATTTTATTGGGTTTTGGTTTTAT
 TTTTTTATTACTATCGGTGGTTAACGGGGTTATTTGTCTAATCTAGTTGGATATTATTTACATGATACTTATTATGATTTAGGCATTTTCATT
ATGTTTTAAGTTGGGGCTGTTTTTGGTATTTTACTGGTATTAGTCTTTGATGAGGGTTATGACTGGTTGTTTTAT

>>>> Iniciadores PROSSER-MODIFICADO
>>>> Iniciadores NOVOS
>>>> Iniciador BOWLES-MODOFICADO

Figura 12. Localização dos três iniciadores desenvolvidos, na região COI de *A. cantonensis*.

4.6 Análise comparativa da eficiência dos iniciadores desenvolvidos para a amplificação das larvas

Previamente à execução dos testes para comparar os iniciadores desenvolvidos, foram realizadas duas tentativas de padronizar a massa de DNA inicial, onde foram testadas diferentes diluições (0,7; 0,5; 0,1; 0,07; 0,04 e 0,01). No entanto, embora todos os iniciadores desenvolvidos tenham sido eficazes para amplificar as espécies de *Angiostrongylus* aqui estudadas, os resultados das amplificações com diferentes diluições demonstraram haver divergência entre as espécies analisadas, independente da concentração de DNA inicial (Figura 13).

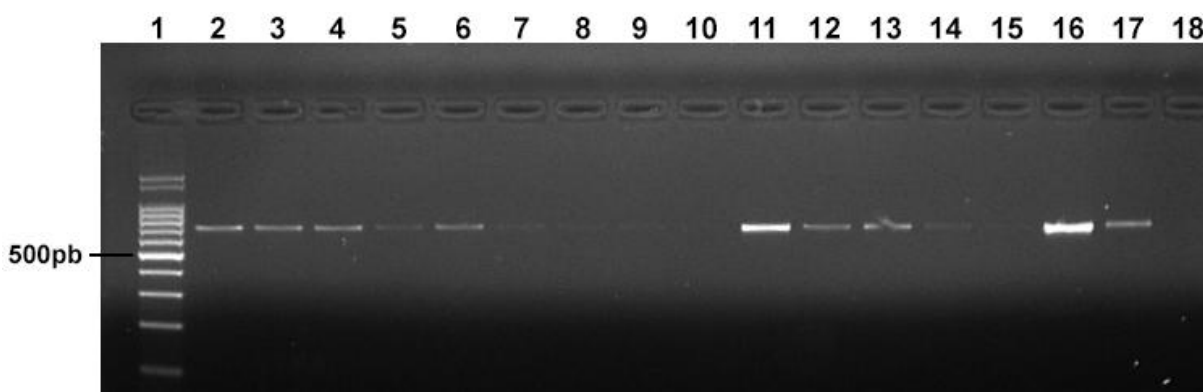


Figura 13. PCR para padronização da massa inicial de DNA: canaleta 1) padrão de peso molecular, canaletas de 2 a 5) *A. cantonensis* (diluições: 0,1; 0,07; 0,04; 0,01, respectivamente), canaletas de 6 a 10) *A. vasorum* (0,7; 0,1; 0,07; 0,04; 0,01), canaletas de 11 a 15) *A. costaricensis* (0,5; 0,1; 0,07; 0,04; 0,01), canaletas 16 e 17) controles positivos (*A. cantonensis*), extraídos com nitrogênio (Protocolo 1), canaleta 18) controle negativo.

Assim sendo, optou-se por selecionar uma única espécie (*A. cantonensis*) para os testes de comparação dos iniciadores quanto ao resultado do sequenciamento.

As figuras 14, 15 e 16 mostram o resultado das amplificações das amostras de *A. cantonensis* utilizadas para a comparação dos iniciadores desenhados, mostrando que todas foram bem sucedidas.

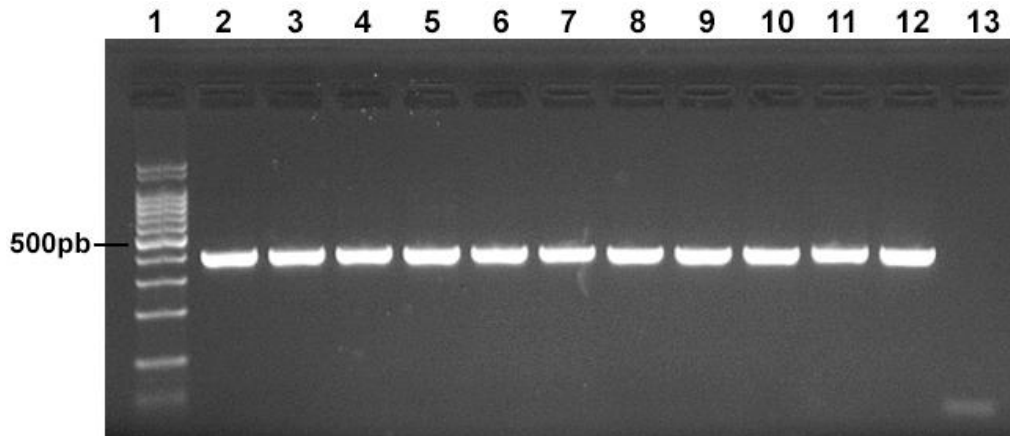


Figura 14. Gel da PCR, agarose 1,5%, de quatro amostras de *A. cantonensis* (canaletas 2 a 5), três de *A. costaricensis* (canaletas 6 a 8), três de *A. vasorum* (canaletas 9 a 11) e uma de *Ae. abstrusus* (canaleta 12), com os **iniciadores Bowles-Modificado**.

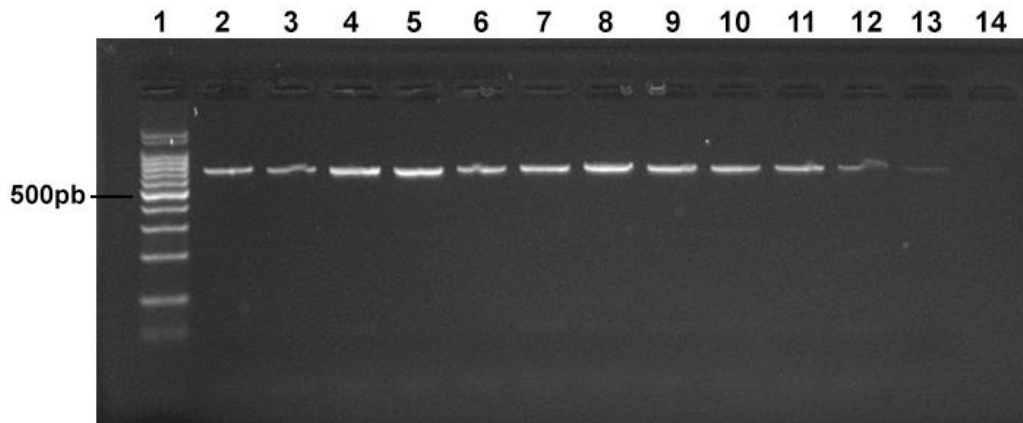


Figura 15. Gel da PCR, agarose 1,5%, de quatro amostras de *A. cantonensis* (canaletas 2 a 5), três de *A. costaricensis* (canaletas 6 a 8), três de *A. vasorum* (canaletas 9 a 11) e duas de *Ae. abstrusus* (canaletas 12 e 13), com os **iniciadores Prosser-Modificado**.

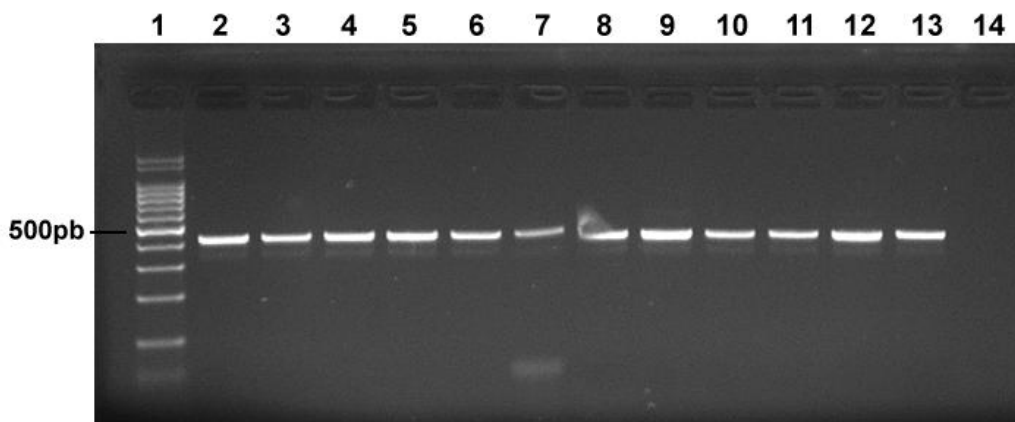


Figura 16. Gel da PCR, agarose 1,5%, de quatro amostras de *A. cantonensis* (canaletas 2 a 5), três de *A. costaricensis* (canaletas 6 a 8), três de *A. vasorum* (canaletas 9 a 11), uma de *A. cantonensis* como controle positivo (canaleta 12) e uma de *Ae. abstrusus* (canaleta 13), com os **iniciadores novos**.

4.6.1 Análise das sequências geradas com os iniciadores Bowles-Modificado

Das 10 amostras da espécie *A. cantonensis* amplificadas com os iniciadores Bowles-Modificado, apenas uma não resultou em sequência de boa qualidade (sequência *reverse* de *A. cantonensis* 10R). Por outro lado, a sequência *forward* desta mesma amostra apresentou boa qualidade, tendo sido identificada com 100% de similaridade com as sequências de *A. cantonensis* depositadas no GenBank (número de acesso: JX471056.1 e outras).

Outras quatro amostras apresentaram uma linha de base alta e picos um pouco sobrepostos nas primeiras posições de pares de bases (até a posição 100, aproximadamente). Estas foram as sequências: *A. cantonensis* 03F; *A. cantonensis* 06(R); *A. cantonensis* 08F e *Ae. abstrusus* 11F que, contudo, puderam ser editadas a partir da contraposição dos cromatogramas com suas sequências complementares e da comparação com outras amostras do alinhamento.

Assim, considerando que apenas uma sequência não pôde ser aproveitada, houve um aproveitamento de 95% das sequências obtidas com esses iniciadores. Além disso, a única sequência que apresentou má qualidade não inviabilizou a identificação da espécie, tendo sido possível o diagnóstico de 100% das amostras.

Após editadas, as sequências *forward* apresentaram entre 258 e 330 pares de bases (duas foram mais curtas: *A. cantonensis* 03F e *A. cantonensis* 08F), enquanto as sequências *reverse* apresentaram 330 pares de bases. A parte comum à ambas as sequências (*forward* e *reverse*) totalizou 330 pares de bases (com exceção de *A. cantonensis* 03F e *A. cantonensis* 08F).

Apesar da melhor intensidade de bandas ter sido observada com as amostras amplificadas por esses iniciadores (Figura 15), eles não foram aqueles cujo maior número de sequências boas foram obtidas.

A sequência de *Ae. abstrusus* apresentou uma identidade de 97.29% com uma sequência parcial do mitogenoma desta espécie depositada no GenBank (GU138120.1) e se mostrou bastante distante das espécies *A. vasorum* (>10%) e *A. costaricensis*, que não apareceu entre as no *ranking* das 100 primeiras listadas. No entanto, não separou muito bem da espécie *A. cantonensis*, que apresentou 94.91% de similaridade.

4.6.2 Análise das sequências geradas com os iniciadores Prosser-Modificado

Dentre as 10 amostras de *A. cantonensis* amplificadas com os iniciadores Prosser-Modificado, três não apresentaram boa qualidade (sequência *A. cantonensis* 1R, *A. cantonensis* 4F, *A. cantonensis* 5F). Uma sequência também estava em parte ruim (aproximadamente 100 pares de bases), com linha de base alta e picos sobrepostos (*A. cantonensis* 07R). Por outro lado, as sequências complementares obtidas para estas amostras apresentaram qualidade muito boa. Desta forma, as 10 amostras investigadas puderam ser molecularmente identificadas, sendo idênticas entre si e apresentando 100% de similaridade com sequências de *A. cantonensis*, depositadas no GenBank (JX471056.1 e outras).

Após a edição, as sequências *forward* apresentaram entre 639 a 655 pares de bases com estes iniciadores, enquanto as sequências *reverse* apresentaram de 637 a 651 pares de bases. A parte comum a ambas as sequências (*forward* e *reverse*) totalizou 608 pares de bases (com exceção de *A. cantonensis* 03F e *A. cantonensis* 08F, que foram sequências mais curtas).

A amostra de *A. abstrusus* obtida com os iniciadores Prosser-Modificado também foi sequenciada com sucesso, onde o *blast* com esta sequência apresentou 99.69% de identidade com a sequência do genoma mitocondrial completo desta espécie depositado no GenBank (JX519458.1). Quando comparada com sequências das espécies *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*, a sequência da espécie *Ae. abstrusus* apresentou uma diferença maior que 11% (88.43%, 88,07% e 88.01%, respectivamente) quanto à similaridade genética.

4.6.3 Análise das sequências geradas com os iniciadores novos

Das 10 amostras de *A. cantonensis* amplificadas com os iniciadores novos, apenas uma não apresentou boa qualidade, não sendo possível utilizá-la (sequência *A. cantonensis* 02F). Por outro lado, a sequência *reverse* desta mesma amostra foi sequenciada com sucesso, tendo sido identificada com 100% de similaridade com a sequência do COI de *A. cantonensis*, depositada no GenBank (MF000735.1 e outras).

Outras cinco amostras apresentaram uma linha de base alta e picos um pouco sobrepostos nas primeiras posições de pares de bases (até a posição 100,

aproximadamente). Estas foram as sequências *A. cantonensis* 05 (F e R); *A. cantonensis* 08 (F e R); *A. cantonensis* 09F, que, contudo, puderam ser editadas a partir da comparação dos cromatogramas de outras sequências do mesmo haplótipo. Portanto, houve um aproveitamento de 95% das sequências. Além disto, a única sequência ruim obtida não inviabilizou a identificação da espécie, tendo sido possível o diagnóstico de 100% das amostras.

As sequências *forward* apresentaram entre 361 e 373 pares de bases com estes iniciadores, enquanto as sequências *reverse* entre 362 a 375 pares de bases. A parte comum a ambas as sequências (*forward* e *reverse*) totalizou 322 pares de bases.

A sequência de *Ae. abstrusus* obtida com os iniciadores novos mostrou 99.27% de similaridade com sequência do mitocondrial completo desta espécie depositada no GenBank (JX519458.1). Já em relação as espécies *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*, a sequência de *Ae. abstrusus* apresentou 89.05%, 88,08% e 88,32% de similaridade, respectivamente.

A síntese dos resultados alcançados para as 20 sequências de *A. cantonensis* geradas a partir dos diferentes iniciadores é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado da análise comparativa da qualidade das sequências geradas a partir de diferentes iniciadores para as 20 sequências de *Angiostrongylus cantonensis* obtidas.

Iniciadores	Nº de pares de bases amplificado*	Nº de sequências boas	Nº sequências parcialmente boas	Nº sequências ruins	Número de amostras diagnosticadas
Prosser-Modificado	608	16	1	3	100%
Bowles-Modificado	330	16	3	1	100%
Iniciadores novos	322	14	5	1	100%

*Alinhamento final, com fragmentos do mesmo tamanho para 10 sequências *forward* e 10 sequências *reverse*, com indicação do tamanho do fragmento obtido, representado pelo número de pares de bases amplificados, número de amostras sequenciadas com sucesso (sequências boas), número de sequências ruins (não aproveitadas) e número de amostras diagnosticadas através do *blast* da sequência no GenBank.

NIH U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information Log in

BLAST⁺ » blastn suite » results for RID-6ZKZVPPA014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title Nucleotide Sequence

RID 6ZKZVPPA014 [Search expires on 03-18 03:14 am](#) [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID lcl|Query_53891

Description None

Molecule type dna

Query Length 330

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism *only top 20 will appear* exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Manage Columns](#) Show [?](#)

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis voucher CHIQC-35861 cytochrome c oxidase subunit I gene, partial cds: mitochondrial	610	610	100%	1e-170	100.00%	JX471056.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis voucher 9663 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	610	610	100%	1e-170	100.00%	GU138111.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis voucher 9662 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	610	610	100%	1e-170	100.00%	GU138110.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate CHIQC 35738a cytochrome c oxidase subunit 1 gene, partial cds: mitochondrial	610	610	100%	1e-170	100.00%	JQ595406.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis cytochrome c oxidase subunit 1 gene, partial cds: mitochondrial	610	610	100%	1e-170	100.00%	HQ440217.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	604	604	100%	6e-169	99.70%	MN227185.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate SYD.1 mitochondrion, complete genome	604	604	100%	6e-169	99.70%	MK570631.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate TEN.1 mitochondrion, complete genome	604	604	100%	6e-169	99.70%	MK570629.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate 1573angio cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	604	604	100%	6e-169	99.70%	MH069734.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis mitochondrial DNA, complete genome	604	604	100%	6e-169	99.70%	AP017672.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis voucher 9660 cytochrome oxidase subunit I-like (COI) gene, partial sequence: mitochondrial	603	603	100%	2e-168	99.70%	GU138109.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate 1577angio cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	593	593	100%	1e-165	99.09%	MH069735.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate 1561angio cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	593	593	100%	1e-165	99.09%	MH069733.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate 1500angio cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	593	593	100%	1e-165	99.09%	MH069732.1

Figura 17 - Print screen do ranking do blast realizado no GenBank, com uma seqüência de 330 pares de base da espécie *A. cantonensis*, utilizando os iniciadores Bowles-Modificado.

NIH U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information Log in

BLAST® » blastn suite » results for RID-6ZKJJ2Z8014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[← Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title Nucleotide Sequence

RID 6ZKJJ2Z8014 Search expires on 03-18 03:06 am [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID lcl|Query_20725

Description None

Molecule type dna

Query Length 608

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate Barra dos Coqueiros cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1123	1123	100%	0.0	100.00%	MH511542.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_SYD.1 mitochondrion, complete genome	1123	1123	100%	0.0	100.00%	MK570631.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_TEN.1 mitochondrion, complete genome	1123	1123	100%	0.0	100.00%	MK570629.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_A cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1123	1123	100%	0.0	100.00%	MF000735.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis mitochondrial DNA, complete genome	1123	1123	100%	0.0	100.00%	AP017672.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate Barra dos Coqueiros cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1114	1114	100%	0.0	99.67%	MH547424.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_B cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1112	1112	100%	0.0	99.67%	MF000736.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_P49-19A cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	1090	1090	100%	0.0	99.01%	MN814828.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_P48-19B cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	1090	1090	100%	0.0	99.01%	MN814827.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_P40-19A cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	1090	1090	100%	0.0	99.01%	MN814826.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_FH.1 mitochondrion, complete genome	1090	1090	100%	0.0	99.01%	MK570632.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_HAW.1 mitochondrion, complete genome	1090	1090	100%	0.0	99.01%	MK570630.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate_PP cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	1090	1090	100%	0.0	99.01%	KY779736.1

Figura 18. Print screen do ranking do blast realizado no GenBank, com a uma sequência de 608 pares de base da espécie *A. cantonensis*, utilizando os iniciadores Prosser-Modificado.

NIH U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information Log in

BLAST® » blastn suite » results for RID-6ZJX5AZZ014 Home Recent Results Saved Strategies Help

[← Edit Search](#) Save Search Search Summary ▾

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title Nucleotide Sequence

RID 6ZJX5AZZ014 Search expires on 03-18 02:55 am [Download All](#) ▾

Program BLASTN [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID lcl|Query_22503

Description None

Molecule type dna

Query Length 322

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments [Download](#) ▾ [Manage Columns](#) ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate Barra dos Coqueiros cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	595	595	100%	4e-166	100.00%	MH511542.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate Barra dos Coqueiros cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	595	595	100%	4e-166	100.00%	MH547424.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate SYD.1 mitochondrion, complete genome	595	595	100%	4e-166	100.00%	MK570631.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate TEN.1 mitochondrion, complete genome	595	595	100%	4e-166	100.00%	MK570629.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate A cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	595	595	100%	4e-166	100.00%	MF000735.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis mitochondrial DNA, complete genome	595	595	100%	4e-166	100.00%	AP017672.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate Sao Cristovao cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	590	590	100%	2e-164	99.69%	MH511540.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate B cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	584	584	100%	8e-163	99.38%	MF000736.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate PP cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	582	582	99%	3e-162	99.38%	KY779736.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate Nossa Senhora do Socorro cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds: mitochondrial	580	580	97%	1e-161	100.00%	MH511539.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate P49-19A cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	577	577	99%	1e-160	99.07%	MN814828.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate P48-19B cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	577	577	99%	1e-160	99.07%	MN814827.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate P40-19A cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds: mitochondrial	577	577	99%	1e-160	99.07%	MN814826.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate FH.1 mitochondrion, complete genome	571	571	99%	6e-159	98.81%	MG900000.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Angiostrongylus cantonensis isolate HAW.1 mitochondrion, complete genome	571	571	99%	6e-159	98.81%	MG900000.1

[Feedback](#)

Figura 19. Print screen do ranking do blast realizado no GenBank, com a uma sequência de 322 pares de base da espécie *A. cantonensis*, utilizando os iniciadores novos.

4.7 Análise comparativa das sequências geradas com os iniciadores propostos para as demais espécies de *Angiostrongylus* estudadas

As três espécies puderam ser diferenciadas entre si a partir dos fragmentos amplificados com todos os três pares de iniciadores propostos.

O blast das sequências de *A. costaricensis* obtidas com esses três pares de iniciadores, apresentaram entre 99.48% e 100% de identidade com as demais sequências depositadas no GenBank para esta espécie (p.ex. GQ398122.1 e KT186242.1). Já o blast com as sequências de *A. vasorum* obtidas com os iniciadores novos e com os Bowles-modificado foram 99.41% similares à sequência de uma população do Brasil (GU138119), enquanto aquelas obtidas com os

iniciadores Prosser-Modificado apresentaram apenas 95.63% de identidade com a sequência parcial do COI depositada no GenBank (GQ982868.1) procedente da Irlanda.

A baixa similaridade encontrada com a sequência da Irlanda, pode ser decorrente da hipótese de ocorrência de espécies distintas na Europa e da América do Sul, sugerida por Jefferies et al. (2009). Estes autores analisaram as regiões COI e ITS de populações de *A. vasorum* e apontaram a existência de dois genótipos distintos.

4.8 Análise de distância genética entre as espécies de *Angiostrongylus* estudadas

Como esperado, por tratar-se de amostras de ciclos mantidos em laboratório, os quais costumam apresentar baixa diversidade genética, um único haplótipo foi encontrado para as três espécies de *Angiostrongylus* analisadas.

Apesar do maior tamanho do fragmento obtido utilizando o iniciador de Prosser-Modificado, a distância genética entre as espécies *A. cantonensis* e *A. costaricensis* foi a mesma para os três marcadores. Já em relação à distância genética entre *A. vasorum* e as espécies *A. cantonensis* e *A. costaricensis* variou, com a maior divergência encontrada nos primers novos, seguida de Prosser-Modificado (Figura 20).

		1	2	3
1	<i>A. cantonensis</i> Bowles-Modificado			
2	<i>A. costaricensis</i> Bowles-Modificado	0,14		
3	<i>A. vasorum</i> Bowles-Modificado	0,11	0,14	
		1	2	3
1	<i>A. cantonensis</i> Prosser-Modificado			
2	<i>A. costaricensis</i> Prosser-Modificado	0,14		
3	<i>A. vasorum</i> Prosser-Modificado	0,13	0,12	
		1	2	3
1	<i>A. cantonensis</i> Iniciadores Novos			
2	<i>A. costaricensis</i> Iniciadores Novos	0,14		
3	<i>A. vasorum</i> Iniciadores Novos	0,15	0,12	

Figura 20. Matrizes de distância genética (p-distance) entre as três espécies de *Angiostrongylus* analisadas, com cada um dos pares de iniciadores desenvolvidos. Valores em percentagem.

Dusitsittipon et al. (2017) relataram ser de 11%, em média, a distância comumente encontrada entre as espécies de nematódeos, considerando o nível de divergência *p-distance*. Assim, os resultados das matrizes de distância genética com os três pares de iniciadores aqui desenvolvidos permitiram a distinguibilidade das principais espécies de *Angiostrongylus* com potencial zoonótico, encontradas no Brasil.

De acordo com Cordeiro (2011) a distinguibilidade é um critério importante para que um diagnóstico molecular seja considerado efetivo. Ainda segundo esta autora, outro quesito igualmente importante para caracterizar a efetividade de um diagnóstico molecular é a sensibilidade. Dessa forma, foram realizados testes quanto à eficiência dos iniciadores propostos na amplificação de apenas uma larva de *Angiostrongylus* spp., para os quais todas as reações funcionaram (Figuras 21, 22 e 23).

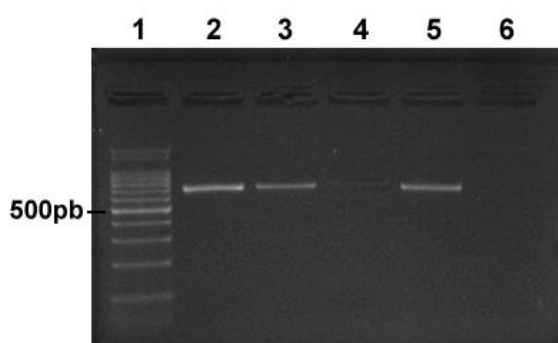


Figura 21. Gel da PCR contendo uma larva de: *A. cantonensis* (canaleta 2), *A. costaricensis* (canaleta 3), *A. vasorum* (canaleta 4), controle positivo, com 10 L3 de *A. cantonensis* (canaleta 5), controle negativo (canaleta 6), com os iniciadores novos.

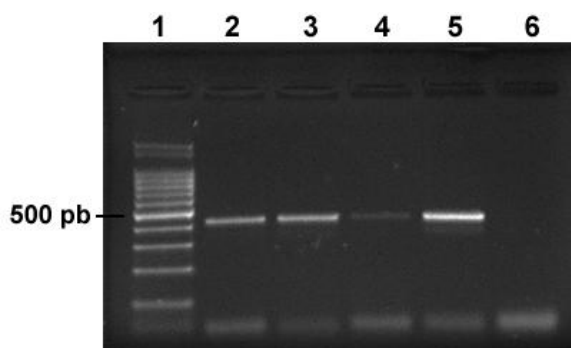


Figura 22. Gel da PCR de uma larva de *A. cantonensis* (canaleta 2), *A. costaricensis* (canaleta 3), *A. vasorum* (canaleta 4) e controle positivo, com 10 L3 de *A. cantonensis* (canaleta 5), com os iniciadores Prosser-Modificado.

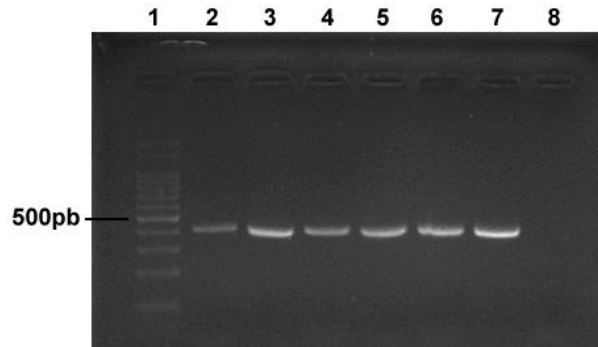


Figura 23. Gel da amplificação com uma larva de duas diferentes amostras de: *A. vasorum* (canaletas 2 e 5), *A. cantonensis* (canaletas 3 e 6) e *A. costaricensis* (canaleta 4 e 7) com o iniciador Bowles-Modificado.

A amplificação das amostras de *A. vasorum* com o iniciador Prosser-Modificado e com o iniciador novo apresentaram bandas fracas (Figuras 22 e 23). Já com o iniciador Bowles-Modificado a amplificação desta espécie foi boa (Figura 24), não apresentando diferença visível quanto à intensidade da banda sobre as amostras das demais espécies.

Como uma etapa adicional aos objetivos, visando verificar se os novos iniciadores poderiam amplificar o DNA do molusco hospedeiro, como ocorrido diversas vezes durante testes realizados anteriormente com os iniciadores de Folmer et al. (1994), foi realizada uma PCR, nas mesmas condições dos testes realizados com as larvas, com DNA das espécies *B. glabrata* e *A. fulica* (Figura 24).

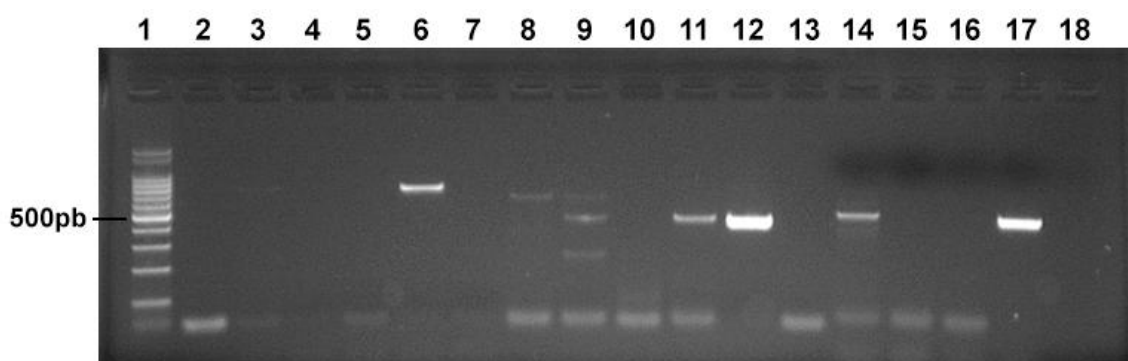


Figura 24. Gel da PCR (volume final 20 μ L) com os iniciadores Prosser-Modificado, Bowles-Modificado e os Novos, respectivamente. Amostras: *A. fulica* com 1 μ L (canaletas 2, 8 e 14) e 2 μ L (canaletas 3 e 9) de DNA, *B. glabrata* com 1 μ L (canaletas 4, 10 e 13) e 2 μ L de DNA (canaletas 5, 11 e 16), controles positivos com 10 L3 de *A. cantonensis* (canaletas 6, 12 e 17) e controles negativos (canaletas 7, 13 e 18), respectivamente.

Os iniciadores Prosser-Modificado mostraram o menor potencial para a amplificação do DNA dos moluscos hospedeiros, demonstrando, portanto, maior especificidade para amostras de nematódeos em comparação aos demais iniciadores. Este resultado, somado ao fato desses iniciadores terem gerado os maiores tamanhos de fragmento amplificado, o que aumenta o potencial de detecção de outras espécies de nematódeos que possam estar ocorrendo, fez com que os iniciadores Prosser-Modificado fossem adotados para o diagnóstico molecular de amostras no LRNEM-IOC.

A partir dos resultados aqui alcançados são sugeridos dois protocolos distintos para a identificação molecular de larvas de *Angiostrongylus* spp., devendo ser levados em consideração os seguintes critérios: 1- os recursos disponíveis (tempo e dinheiro); 2- o objetivo da identificação molecular.

Para estudos de barcode das espécies e suas relações filogenéticas, recomenda-se a extração de DNA com o uso de kits comercial e a amplificação com os iniciadores Prosser-modificado, pois estas metodologias recuperam sequências de DNA maiores (protocolo completo no Anexo 7.6).

Para o diagnóstico específico de rotina de larvas de *Angiostrongylus* spp., poderão ser utilizadas ambas as técnicas de choque térmico aqui propostas (Protocolos 1 e 6), por apresentarem baixo custo e menor tempo de execução. A amplificação poderá ser realizada com qualquer um dos três pares de iniciadores desenvolvidos neste trabalho, levando-se em conta que quanto menor a sua sequência, mais barata fica a sua síntese. Este protocolo completo está disponível no Anexo 7.7.

5 CONCLUSÕES

O procedimento de preparo das amostras mostrou-se decisivo para o sucesso das etapas subsequentes, principalmente da PCR, reduzindo o número de reações necessárias para o diagnóstico molecular específico das larvas no LRNEM.

A extração de DNA com kit comercial foi a que apresentou os melhores resultados quanto à pureza do DNA obtido e também gerou sequências com cerca de 100 pares de base a mais do que os protocolos com choque térmico.

Os métodos envolvendo choque térmico geraram um produto da extração rico em contaminantes, mas tiveram bons resultados nas reações de PCR e mostraram-se eficientes para o diagnóstico das larvas por sequenciamento. Estes métodos também tiveram uma execução mais rápida, não geraram resíduo químico e apresentaram o menor custo.

Todos os iniciadores desenvolvidos permitiram a amplificação das regiões de interesse nas diferentes espécies de *Angiostrongylus* analisadas. As regiões sequenciadas permitiram a diferenciação entre estas espécies e o diagnóstico molecular de todas as amostras analisadas. Esses iniciadores também mostraram eficiência para amplificar o fragmento alvo a partir de uma única larva, embora um número menor de amostras tenha sido analisado neste teste.

Os diferentes iniciadores e métodos de extração testados representam diferentes possibilidades para o diagnóstico de larvas de *Angiostrongylus* spp. e o seu uso deverá levar em conta os recursos disponíveis (tempo e dinheiro) e o objetivo do estudo.

Os resultados apresentados constituem alternativas de execução simples, rápida e de baixo custo em importantes etapas do diagnóstico molecular de larvas de nematódeos de interesse médico presentes em moluscos, demonstrando viabilidade de aplicação pelos laboratórios do Serviço de Saúde e contribuindo para estudos epidemiológicos e de controle das parasitoses associadas a esses vetores.

Os resultados aqui obtidos representaram, ainda, o fim da necessidade de infecção experimental rotineira de roedores para o diagnóstico de espécies de nematódeos no LRNEM-IOC.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Soud WA, Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3748–53.

Andrade-Porto SM, Souza KCP, Cárdenas MQ, Roque RA, Pimpão DM, Araújo CS, et al. Occurrence of *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) larvae (Nematoda: Metastrongylidae) infecting *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) in the Amazon region. *Acta Amaz.* 2012;42(2):245–50.

Arseneau JR, Steeves R, Laflamme M. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Mol Ecol Resour.* 2017;17(4):686–93.

Barbosa TA, Thiengo SC, Moraes JM, Mourão FRP, Martins MAC, Martins ICD, et al. Ações de vigilância em saúde após resultados da investigação epidemiológica do primeiro caso de meningite eosinofílica no Amapá [Apresentação no 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2019 jul 27-31; Belo Horizonte, Brasil].

Bessetti BJ. An Introduction to PCR Inhibitors. *Promega Notes.* 2007;9–10.

Blaxter ML, Dorris M, De Ley P, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature.* 1998;392(6671):71–5.

Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, Denkert C, Dietel M, Fernandez PL, et al. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* 2010;457(3):309–17.

Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;54(2):165–73.

Caldeira RL, Carvalho OS, Mendonça CLGF, Graeff-Teixeira C, Silva MF, Ben R, et al. Molecular Differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(8):1039-1043.

Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima

WS, et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(7):887–9.

Červená B, Modrý D, Fecková B, Hrazdilová K, Foronda P, Alonso AM, et al. Low diversity of *Angiostrongylus cantonensis* complete mitochondrial DNA sequences from Australia, Hawaii, French Polynesia and the Canary Islands revealed using whole genome next-generation sequencing. Parasit Vectors [Internet]. 2019;12(1):1–13.

Chen R, Tong Q, Zhang Y, Lou D, Kong Q, Lv S, et al. Loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of *Angiostrongylus cantonensis* infection in *Pomacea canaliculata*. Parasit Vectors. 2011;4:204. doi: 10.1186/1756-3305-4-204 doi: 10.1186/1756-3305-4-204.

Constantino-Santos DMA, Basiao ZU, Wade CM, Santos BS, Fontanilla IKC. Identification of *Angiostrongylus cantonensis* and other nematodes using the SSU rDNA in *Achatina fulica* populations of Metro Manila. Trop Biomedicine. 2014;31(2):327–335.

Cordeiro MCR. Biotecnologia e Diagnósticos Moleculares. In: Faleiro FG, Monteiro de Andrade SR, Reis Júnior FB. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2011. Página 196.

Cowie RH. Annotated catalogue of species of *Angiostrongylus* and the related genera *Gallegostrongylus*, *Rodentocaulus* and *Stefanskostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea, Angiostrongylidae). J Helminthol. 2019:1–35. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000270>.

Crowder CD, Rounds MA, Phillipson CA, Picuri JM, Heather E, Halverson J, et al. Extraction of Total Nucleic Acids From Ticks for the Detection of Bacterial and Viral Pathogens. 2011;47(1):89–94.

Dusitsittipon S, Criscione CD, Morand S, Komalamisra C, Thaenkham U. Cryptic lineage diversity in the zoonotic pathogen *Angiostrongylus cantonensis*. Mol Phylogenet Evol. 2017;107: 404-414.

Eamsobhana P, Song SL, Yong HS, Prasartvit A, Boonyong S, Tungtrongchitr A. Cytochrome c oxidase subunit I haplotype diversity of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). Acta Trop;2017;171(March):141–5.

Elsasser SC, Floyd R, Hebert PN, Schulte-Hostedde AI. Species identification of North American guinea worms (Nematoda: Dracunculus) with DNA barcoding. *Mol Ecol Resour.* 2009;9:707-712.

Fetterer RH, Roads ML. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet Parasitol.* 1993;46:103-111.

Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M. Molecular barcodes for soil nematodes. *Mol Ecol.* 2002;11:839–50.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*;1994;3(5):294–9.

Graeff-Teixeira C, Morera P. Métodos de digestão em ácido clorídrico para isolamento e larvas de Metastrongilídeos. *Biociências*;1995;3:85-89.

Grewal PS, Grewal SK, Tan L, Adams BJ. Parasitism of molluscs by nematodes: Types of associations and evolutionary trends. *J Nematol* 2003;35(2):146-156.

Hoorfar J, Wolffs P, Rådström P. Diagnostic PCR: Validation and sample preparation are two sides of the same coin. *Apmis.* 2004;112(11–12):808–14.

Hussing C, Kampmann ML, Mogensen HS, Børsting C, Morling N. Comparison of techniques for quantification of next-generation sequencing libraries. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2015;5:e276–8.

Jefferies R, Shaw SE, Viney ME, Morgan ER. *Angiostrongylus vasorum* from South America and Europe represent distinct lineages. *Parasitology.* 2009;136(1):107–15.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. *Glow Discharge Spectroscopies.* Springer Science & Business Media, 2013. 2001;39(2):613–7.

Lima ARMC, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ERP, Rosa LRS, Duarte FS, et al. Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*;2009;67(4):1093-1096.

Liu C, Song Y, Zhang HQ, Chen RL, Xu MX, Ai MJ, et al. Specific detection of *Angiostrongylus cantonensis* in the snail *Achatina fulica* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Mol Cell Probes*. 2011;25(4):164-167.

Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, et al. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(2):e368.

Margam VM, Gachomo EW, Shukle JH, Ariyo OO, Seufferheld MJ, Kotchoni SO. A simplified arthropod genomic-DNA extraction protocol for polymerase chain reaction (PCR)-based specimen identification through barcoding. *Mol Biol Rep*. 2010;37(7):3631–5.

Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific Inc; 2015. Technical Note 52646.

Mega NO, Revers LF. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. *Ciência Rural*. 2011;41(9):1563–70.

Monte TCC, Simes RO, Oliveira APM, Novaes CF, Thiengo SC, Silva AJ, et al. Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data. *Parasite Vector*. 2012;5(1).

Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: An emergent disease in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(4):399–407.

Morgan ER, Shaw SE, Brennan SF, Waal TD, Jones BR, Mulcahy G. *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. *Trends Parasitol*. 2005;21(2):49-51.

Morley NJ. Aquatic molluscs as auxiliary hosts for terrestrial nematode parasites: implications for pathogen transmission in a changing climate. *Parasitology*. 2010;137(7):1041-1056.

Oliveira APM, Lopes Torres EP, Maldonado Jr A., Barros Araujo JL, Fernandez MA, Thiengo SC. *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse. *Rev Patol Trop*. 2010;39(3):199–210.

Ohlweiler FP, Guimarães MCA, Takahashi FY, Eduardi JM. Current distribution of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 in the State of Sao Paulo including

records of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda) larvae infestation. Rev Inst Med Trop S. Paulo. 2010;52(4):211-4.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraeve WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. Genet. Mol Res. 2008;7(3):861-871.

Oxford Genes Technology. Understanding and measuring variations in DNA sample quality. Oxford Genes Technology the Molecular Genetics Company; 2018

Penagos-Tabares F, Lange MK, Chaparro-Gutiérrez JJ, Taubert A, Hermosilla C. *Angiostrongylus vasorum* and *Aelurostrongylus abstrusus*: Neglected underestimated parasites in South America. Parasit. Vectors [Internet]. 2018;11(208):1-13

Pereira PR, Argenta FF, Rolim VM, Oliveira EC. Estudo retrospectivo de pneumonia por *Aelurostrongylus abstrusus* em gatos. Acta Scienti Veterinari. 2017;55:1–8.

Prosser SWJ, Velarde-Aguilar MG, Leon-Regargnon V, Hebert PDN. Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. Mol Ecol Reserch. 2013;13:1108–1115

Pozio E e La Rosa G. PCR-Derived Methods for the Identification of Trichinella Parasites from Animal and Human Samples. PCR Detect Microb Pathog. 2003;216:299–310.

Powers TO, Todd TC, Burnell AM, Murray PC, Fleming CC, Szalanski AL, et al. The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. J Nematol; 1997;29(4):441–50.

Qvarnstrom Y, Aramburu Da Silva AC, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C, et al. Improved molecular detection of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks and other environmental samples with a species-specific internal transcribed spacer based taqMan assay. Appl Environ Microbiol. 2010;76(15):5287–9.

Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Mol Biotechnol.* 2004;26:133-146.

Ramos-de Souza J, Thiengo SC, Fernandez MA, Gomes SR, Corrêa Antônio J, et al. First records of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in Northeastern Brazil, including new global records of natural intermediate hosts. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*;2018;(51): 1-7.

Rebello KM, McKerrow JH, Mota EM, O Donoghue AJ, Neves-Ferreira AGC. Activity profiling of peptidases in *Angiostrongylus costaricensis* first-stage larvae and adult worms. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(10):e0006923.

Rodriguez R, Sandri ASS, Porto SM, Osório JB, Muller CA, et al. Invasive slug *Meghimatium pictum* (Stoliczka, 1873) infected by *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971, and the possible risk of human infection associated with grape consumption. *J Helminthol.* 2018;58–60.

Romero-Alegria A, Belhassen-García M, Velasco-tirado V. *Angiostrongylus costaricensis*: Systematic Review of Case Reports. *Adv Infect Dis.* 2014;(March):36–41.

Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol e Med Lab.* 2011;47(5):541–8.

Silva M, Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. *Revista Árvore.* 2010;34(6);973-978.

Thiengo SC, Fernandez MA, Torres EJ, Coelho PM, Lanfredi RM, et al. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (Lissachatina) *fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. *J Invert Pathology*;2008;98:34-39.

Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres E JL, Caldeira R, Carvalho OS, et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop.* 2010;115(3):194–9.

Valente R, Robles M del R, Navone GT, Diaz JI. *Angiostrongylus* spp. In the Americas: Geographical and chronological distribution of definitive hosts versus disease reports. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(3):143–52.

Zeng X, Wei J, Wang J, Wu F, Fung F, Wu X, et al. Alicata disease. Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco. Brazil. Arq Neuropsiquiatr. 2013;67:1093-1096.

7 ANEXOS

7.1 Detalhamento dos métodos com nitrogênio líquido realizados no piloto 1

Método	Protocolo 1 (Nitrogênio líquido)		Protocolo 4 (Nitrogênio líquido + kit)					
			A		B		C	
Etapas	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação
Lise	larvas + 30µL Tampão PCR	3X (-20° 1min + 95° 20 min)	larvas + 30µL Tampão PCR	3X (-20° 1min + 95° 20 min)	larvas + 30µL Tampão PCR	3X (-20° 1min + 95° 20 min)	larvas + 30µL Tampão PCR	3X (-20° 1min + 95° 20 min)
			20µ Ptnase K + 150 µ tampão lise (ATL)	1 hora	20µ Ptnase K + 150 µ tampão lise (ATL)	4 horas	20µ Ptnase K + 150 µ tampão lise (ATL)	over night (~16horas)
			4 µl RNaseA	3 min	4 µl RNaseA	3 min	4 µl RNaseA	3 min
Precipitação			200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm	200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm	200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm
Lavagem			500 µl AW1	8000 rpm 1min	500 µl AW1	8000 rpm 1min	500 µl AW1	8000 rpm 1min
			500 µl AW2	13000 rpm 3min	500 µl AW2	13000 rpm 3min	500 µl AW2	13000 rpm 3min
Eluição			30 µl AE	30 min 8000 rpm 1min	30 µl AE	30 min 8000 rpm 1min	30 µl AE	30 min 8000 rpm 1min

7.2 Detalhamento do método com kit realizado no piloto 1

Método Etapas	Protocolo 2 (Kit)					
	A II		B II		C II	
	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação
Lise	20µ Ptnase K + 150 µl tampão lise (ATL)	1 hora	20µ Ptnase K + 150 µl tampão lise (ATL)	4 horas	20µ Ptnase K + 150 µl tampão lise (ATL)	over night (~16horas)
	4 µl RNaseA	3 min	4 µl RNaseA	3 min	4 µl RNaseA	3 min
Precipitação			200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm	200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm
Lavagem	500 µl AWI	8000 rpm 1min	500 µl AWI	8000 rpm 1min	500 µl AWI	8000 rpm 1min
	500 µl AW2	13000 rpm 3min	500 µl AW2	13000 rpm 3min	500 µl AW2	13000 rpm 3min
Eluição	30 µl AE	30 min	30 µl AE	30 min	30 µl AE	30 min
		8000 rpm 1min		8000 rpm 1min		8000 rpm 1min

7.3 Detalhamento dos métodos com pérolas de zircônio realizados no piloto 1

Método Etapas	Protocolo 3A (Pérolas de zircônio)		Protocolo 5 (Pérolas de zircônio + kit)					
			A II		B II		C II	
	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação
Lise	larvas + 30µL Tampão PCR	100°C 10 min	larvas + 30µL Tampão PCR	100°C 10 min	larvas + 30µL Tampão PCR	100°C 10 min	larvas + 30µL Tampão PCR	100°C 10 min
	10 mg pérolas ptnase K	0° 10 min 12000 rpm 10 min vortex 2min 56°C 4 horas 100° C 10min 0°C 10min 12000 rpm 10 min	10 mg pérolas ptnase K + 150 µl tampão lise (ATL) 4 µl RNaseA	0° 10 min 12000 rpm 10 min vortex 2min 56°C 1 hora 3 min 100° C 10min 0°C 10min 12000 rpm 10 min resgatar sobrenadante	0° 10 min 12000 rpm 10 min vortex 2min 56°C 4 horas 3 min 100° C 10min 0°C 10min 12000 rpm 10 min resgatar sobrenadante	0° 10 min 12000 rpm 10 min vortex 2min 56°C 4 horas 3 min 100° C 10min 0°C 10min 12000 rpm 10 min resgatar sobrenadante	10 mg pérolas ptnase K + 150 µl tampão lise (ATL) 4 µl RNaseA	0° 10 min 12000 rpm 10 min vortex 2min 56°C 16 hora 3 min 100° C 10min 0°C 10min 12000 rpm 10 min resgatar sobrenadante
Precipitação			200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm	200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm	200 µl Etanol + 200 µl tampão AL	10 min 8000 rpm 1min 8000 rpm
Lavagem			500 µl AW1 500 µl AW2	8000 rpm 1min 13000 rpm 3min	500 µl AW1 500 µl AW2	8000 rpm 1min 13000 rpm 3min	500 µl AW1 500 µl AW2	8000 rpm 1min 13000 rpm 3min
Eluição		resgatar sobrenadante	30 µl AE	30 min 8000 rpm 1min	30 µl AE	30 min 8000 rpm 1min	30 µl AE	30 min 8000 rpm 1min

7.4 Detalhamento dos métodos com miçangas e freezer realizados no piloto 2

Método	Protocolo 6 (Freezer)		Protocolo 7 (A e B)		Protocolo 7 C	
Etapas						
	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação	Reagentes	Incubação/ centrifugação
Lise	larvas + 30µL Tampão PCR	3X (-0°C 20min + 95°C 20 min)	larvas + 30µL Tampão PCR	100°C 10 min 0°C 10 min 12000rpm 10min	larvas + 30µL Tampão PCR	100°C 10 min 0°C 10 min vortex 2min
	3X 1000rpm 30seg		3 miçangas (7A)		3 miçangas	12000rpm 10min
			5 miçangas (7B)	vortex 2min		
			Proteinase K	56°C 4 horas 100°C 10min 0°C 10min 12000rpm 10min resgatar sobrenadante	Proteinase K	56°C 4 horas 100°C 10min 0°C 10min 12000rpm 10min resgatar sobrenadante

7.5 Dados brutos das medições em NanoDrop, dos testes do Piloto 2.

Método de extração	NanoDrop - Ácidos nucleicos ng/μl	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
Protocolo 1	107,7	2,15	1,60	1,34	0,91
	221,5	4,43	3,75	1,18	1,06
	37,3	0,75	0,43	1,72	2,03
	32,7	0,65	0,42	1,56	0,87
	46,6	0,93	0,68	1,39	0,83
Protocolo 2	261,9	5,24	4,35	1,21	0,85
	10,7	0,21	0,12	1,82	0,40
	9,9	0,20	0,11	1,83	0,40
	10,0	0,20	0,11	1,85	0,39
	7,8	0,16	0,08	1,84	0,40
Protocolo 3A	61,1	1,22	0,94	1,30	0,69
	48,2	0,97	0,73	1,32	0,64
	-11,4	0,23	-0,21	1,09	0,35
	197,9	3,96	6,88	0,58	0,25
	244,7	4,89	4,86	1,01	0,53
Protocolo 3B	241,9	4,84	7,92	0,61	0,33
	103,2	2,06	2,81	0,73	-0,37
Protocolo 7A	118,3	2,37	3,95	0,60	0,19
	190,3	3,81	6,49	0,59	0,24
	262,6	5,25	5,78	0,91	0,40
	447,6	8,95	8,28	1,08	1,06
	176,2	3,52	6,11	0,58	0,23
Protocolo 7B	175,1	3,50	6,11	0,57	0,22
	122,4	2,45	3,93	0,62	0,19
Protocolo 7C	250,0	5,00	8,14	0,61	0,33
	147,1	2,94	4,18	0,70	0,25
	109,2	2,18	0,56	3,87	-0,57
Protocolo 6	54,4	1,09	0,79	1,38	0,79
	334,6	6,70	3,76	1,78	1,18
	26,3	0,52	0,30	1,72	1,19
	37,7	0,75	0,60	1,34	1,32
	27,7	0,55	0,32	1,73	1,53
Protocolo 8A	25,6	0,51	0,37	1,41	3,65
	8,3	0,17	0,10	1,65	0,60
	6,3	0,13	0,10	1,20	0,34
	8,5	0,17	0,10	1,64	0,53
	11,8	0,24	0,14	1,64	0,44
Protocolo 8B	11,1	0,22	0,14	1,63	0,47
	10,1	0,20	0,14	1,43	0,43
	7,7	0,15	0,10	1,59	0,55
	7,8	0,15	0,10	1,58	0,51
	7,9	0,16	0,09	1,73	0,51
Protocolo 8C	9,7	0,20	0,11	1,72	-1,53
	8,5	0,17	0,09	1,72	0,44
	8,9	0,18	0,18	1,66	0,44
	10,6	0,21	0,15	1,38	0,46
	4,3	0,09	0,08	1,05	1,37
Protocolo 8C	5,3	0,10	0,10	1,10	0,98
	0,2	0,00	0,02	0,18	0,03
	1,4	0,03	0,02	1,03	0,09
	0,5	0,01	0,02	0,54	0,05

7.6 Protocolo molecular sugerido para estudo de barcode e relações filogenéticas das espécies de *Angiostrongylus*.

PROCEDIMENTO	ITEM
1- Centrifugar 10mL do produto da digestão artificial a 1.500 rpm por 8 minutos e descartar o sobrenadante	3.1
2- Completar o volume com solução salina tamponada com fosfato (PBS), 1X	3.1
3- Centrifugar novamente, nas mesmas condições de rotação e tempo, e transferir as amostras para uma placa de Petri	3.1
4- Realizar a triagem das larvas de <i>Metastrongyloidea</i> com uma micropipeta, evitando aspirar detritos, e transferir para outra placa ou poço	3.3
5- Selecionar 10 larvas, aspirando o mínimo de líquido possível e alocar em um microtubo de 1,5mL	3.3
6- Realizar a extração de DNA com kit para extração de tecido animal, com no mínimo 4 horas de incubação para a etapa de lise do tecido	3.5.1 (7.2)
7- Realizar a PCR convencional, utilizando o par de iniciadores Prosser-Modificado e a ciclagem correspondente	3.4
8- Conferir o resultado da amplificação através de uma eletroforese em gel de agarose, 1,5%	3.4
9- Purificar o produto da PCR, preferencialmente com o uso de kits para esta finalidade	3.5.3
10- Proceder ou enviar a amostra para o sequenciamento de Sanger, com os mesmos iniciadores utilizados para a amplificação	3.5.3
11- Efetuar a edição e o alinhamento da sequência utilizando softwares destinados a esse objetivo	3.8
12- Realizar a identificação específica, através da inserção da sequência em bancos de genes on-line ou outra análise de distância genética adequada	3.8

7.7 Protocolo molecular sugerido para o diagnóstico de rotina de larvas de *Angiostrongylus* spp.

PROCEDIMENTO	ITEM
1- Centrifugar 10mL do produto da digestão artificial a 1.500 rpm por 8 minutos e descartar o sobrenadante	3.1
2- Completar o volume com solução salina tamponada com fosfato (PBS), 1X	3.1
3- Centrifugar novamente, nas mesmas condições de rotação e tempo, e transferir as amostras para uma placa de Petri	3.1
4- Realizar a triagem das larvas de Metastrongyloidea com uma micropipeta, evitando aspirar detritos, e transferir para outra placa ou poço	3.3
5- Selecionar 10 larvas, aspirando o mínimo de líquido possível e alocar em um microtubo de 1,5mL	3.3
6- Realizar a extração de DNA com um dos protocolos de choque térmico descritos neste trabalho (Protocolo 1 ou Protocolo 6)	3.5.1 (7.1) e 3.5.2 (7.4)
7- Realizar a PCR convencional, utilizando um dos três pares de iniciadores aqui desenvolvidos com as ciclagens correspondentes	3.4 e 3.8
8- Conferir o resultado da amplificação através de uma eletroforese em gel de agarose, 1,5%	3.4
9- Purificar o produto da PCR, preferencialmente com o uso de kits para esta finalidade	3.5.3
10- Proceder ou enviar a amostra para o sequenciamento de Sanger, com os mesmos iniciadores utilizados para a amplificação	3.5.3
11- Efetuar a edição e o alinhamento da sequência utilizando softwares destinados a esse objetivo	3.8
12- Realizar a identificação específica, através da inserção da sequência em bancos de genes on-line ou outra análise de distância genética adequada	3.8