

# DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *STRONGYLUS SPP.* (STRONGYLOIDEA: STRONGYLINAE) PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

A. N. DUARTE<sup>1,3</sup>, M. L. A. RODRIGUES<sup>1</sup>, A. R. BELLO<sup>2</sup>, H. MOURA<sup>2</sup> & L. F. FERREIRA<sup>3</sup>.

(1) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Centro de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - PV, Seropédica - RJ, Brasil. 23.851-970; (2) Universidade Estadual do Rio de Janeiro - FCM - DEP. PAT. & LAB. - Rio de Janeiro - RJ; (3) FIOCRUZ - ENSP - Rio de Janeiro - RJ.

**SUMÁRIO:** No presente estudo são empregadas técnicas moleculares visando amplificar através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), o segundo espaço interno transcrito (ITS-2) do DNA ribossomal de *Strongylus spp.*, e comparar os mesmos aos de organismos correlatos, sugerindo metodologia que permita o diagnóstico específico. A amplificação de DNA genômico de vermes adultos e de formas larvares com oligonucleotídeos definidos a partir da sequência ITS-2 de *Caenorhabditis elegans*, resultou em sequências com cerca de 240 pares de bases nucleotídicas. Foram também incluídos no estudo, como grupos externos, os DNAs de *Schistosoma mansoni* e *Ascaridia numidae*. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade de aplicação desta tecnologia no diagnóstico desejado, embora ocorra a necessidade de estudos adicionais que permitam a definição de novas sequências iniciadoras da reação de PCR que apresentem maior poder de discriminação espécie-específica.

**PALAVRAS - CHAVE:** *Strongylus*, Identificação de espécies, ITS-2, RFLP-PCR, Diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

Nematóides pertencentes a família *Strongylidae* são parasitos de cavalos e outros eqüídeos. Cerca de 56 espécies desta família são citadas para estes hospedeiros. Os gêneros *Strongylus* (com as espécies *S. vulgaris*, *S. edentatus* e *S. equinus*), *Oesophagodontus*, *Triodontophorus* e *Craterostomum* estão compreendidos na sub-família *Strongylinae*, os demais pertencem à sub-família *Cyathostominae* (LICHTENFELS, 1975). Os ciatostomíneos representam cerca de 95% de prevalência, enquanto os strongilíneos cerca de 5% (HERD, 1990). Dentre os nematóides citados, *S. vulgaris* é a espécie que apresenta maior patogenicidade (SOULSBY, 1982), também a mais freqüente do seu gênero (LICHTENFELS, 1975), embora raramente ocorra em grande número em um único animal (NICHOL & MASTERSON, 1987). Tal patogenicidade é atribuída à migração das formas larvares, que resulta em danos a tecidos de diversos órgãos. Os danos são mais evidenciados no sistema arterial mesentérico, onde ocorre a instalação das larvas de 4o estágio e jovens, causando aneurismas e conseqüentemente bloqueio da circulação, resultando em cólicas, hemorragias, enfraquecimento e em alguns casos na morte do hospedeiro (MCGRAW & SLOCOMBE, 1976).

Habitualmente o diagnóstico das infecções por *Strongylus* é feito através do exame de fezes dos eqüinos. Para tanto, são empregadas técnicas de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (GORDON & WHITLOCK, 1939; RODRIGUES *et alii*, 1996) e cultivo de larvas (ROBERT'S & O'SULLIVAN, 1950), não sendo possível a diferenciação das espécies de strongilídeos pela análise morfométrica dos ovos. Esta é alcançada através da observação das larvas de 3o estágio encontradas nas culturas de fezes de 7 a 14 dias após a coleta.

O desenvolvimento de metodologias sensíveis para o diagnóstico das infecções verminóticas é um importante recurso para a adequação do manejo e controle destas. Também, a rápida evidênciação de formas imaturas (ovos e/ou larvas) dos parasitos na pastagem ou nas fezes do hospedeiro, possibilita a agilização das medidas preventivas.

Testes bioquímicos e imunológicos indiretos têm sido avaliados (NICHOL & MASTERSON, 1987; SOULE, 1990), porém sem demonstrar resultados confiáveis para o diagnóstico gênero ou espécie-específico.

Diferentes nematóides parasitos têm sido identificados através da tecnologia dos ácidos nucleicos (DAME *et alii*, 1991; ZARLENGA *et alii*, 1994; STEVENSON *et alii*, 1995). Para tal finalidade, a utilização do RNA e DNA ribossomais (RRNA e RDNA) demonstra ser de maior aplicabilidade pela

sua abundância nos organismos e por sua pouca ou nenhuma variação intraespecífica. Isto ocorre principalmente com o segundo espaço interno transcrito (ITS-2) do rDNA, conforme evidenciado em tricostrongilídeos (GASSER *et alii*, 1994; HOSTE *et alii*, 1995).

Estudos têm sido feitos visando verificar as diferenças entre as seqüências ITS-2 de DNA das espécies do gênero *Trichostrongylus* (GASSER *et alii*, 1993) e das espécies do gênero *Strongylus* (CAMPBELL *et alii*, 1995). Porém, ocorre a necessidade de maiores esforços para a definição de seqüências iniciadoras de polimerização de DNA ("primers") espécie-específicos, possibilitando assim o diagnóstico mais rápido e seguro.

O presente estudo busca ampliar as observações sobre as seqüências ITS-2 de *Strongylus spp.*, comparando-as às de outros organismos filogeneticamente próximos a este gênero, eliminando assim possíveis dúvidas no diagnóstico molecular das espécies em questão. Também, através da elaboração de "primers" espécie-específicos, sugerir metodologia que possibilite o diagnóstico dos ovos e larvas nas fezes e/ou na pastagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção dos parasitos adultos:** Foram obtidos espécimes adultos pertencentes ao gênero *Strongylus* em necrópsias de eqüinos fêmeas sem raça definida (SRD), realizadas no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Outros foram coletados de eqüinos (SRD) de ambos os sexos abatidos no Frigorífico King Meat S/A, em Londrina (Paraná). Após a remoção dos vermes do intestino grosso dos hospedeiros, processou-se a lavagem dos mesmos em solução fisiológica e a identificação através da morfologia, sem diafanização, de acordo com LICHTENFELS (1975), e a preservação por congelamento (-20°C) até serem submetidos à extração do DNA.

**Obtenção das larvas:** Foram realizados OPG e larvacultura de 13 amostras fecais de eqüinos adultos sem raça definida, provenientes do campus da UFRRJ, utilizando, consecutivamente, as técnicas de contagem de ovos de GORDON E WHITLOCK (1939) e de coprocultura (ROBERT'S e O'SULLIVAN, 1950).

As larvas recuperadas das culturas foram identificadas segundo BEVILAQUA *et alii* (1993). O número total de larvas foi estimado a partir de contagem em alíquota de 100 µl. Após a contagem, o excedente foi concentrado por sedimentação e transferido para microtubos.

**Extração do DNA genômico:** A extração do DNA genômico obedeceu basicamente o protocolo de SAMBROOK *et alii*. (1989),

com ligeiras modificações. Os organismos utilizados foram aqueles provenientes do Estado do Rio de Janeiro, exceto *S. equinus*, oriundos do Estado do Paraná. Isolados com cerca de 23 vermes adultos de cada espécie foram submetidos à maceração rápida, até formar massa homogênea. Cada 100 µl do macerado, por espécie, foi ressuspensão em 400 µl de solução 100 mM de Tris / 10 mM de EDTA, 2,5 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 µg de proteinase K, homogeneizado em agitador mecânico e incubado em banho-maria à 56 °C por 2 horas. Após este período a suspensão foram adicionados 200 µl de fenol tamponado (pH 7,8) e 200 µl de clorofórmio e, após suave agitação por inversão do microtubo, a preparação foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 min. em microcentrífuga. Do sobrenadante foram aspirados 300 µl e repetida por duas vezes a extração com fenol / clorofórmio. Finda a última centrifugação, foram transferidos 300 µl do sobrenadante para novo microtubo e a estes adicionados 33 µl de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 800 µl de etanol absoluto. Após nova centrifugação o sedimento era ressuspensão em 1000 µl de etanol 70%, e novamente centrifugado como acima descrito. O sobrenadante era decantado, e o microtubo invertido sobre papel absorvente a fim de se promover a completa secagem do sedimento. A seguir este era ressuspensão em 150 µl de Solução 10 mM de Tris / 1 mM de EDTA.

Aplicou-se o procedimento citado anteriormente em macerados obtidos a partir de 6 espécimes de *Ascaridia numidae*, 150 espécimes de *Schistosoma mansoni* quantidades estimadas em 25.000 larvas de Cyathostominae.

**Eletroforese dos extratos de DNA genômico:** Dos extratos obtidos, 10 µl eram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo (0,5 µg / ml). A amostra era corada pelo tampão de carregamento 6 x (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 20% glicerol / 2 µl por amostra). O tampão utilizado era de borato-EDTA (TBE) 1x (100 mM Tris-borato e 1 mM EDTA / pH 8,0) e as condições de corrida foram: 50 volts (≈ 140 mAmp) por 90 min., em gel de agarose à 0,8%. Utilizamos como marcador de peso molecular DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima *Eco* RI. A presença de bandas com cerca de 20 ng de DNA era visualizada por transluminação do gel por radiação ultravioleta.

**Reação em cadeia da Polimerase (PCR):** As seqüências iniciadoras de polimerização do DNA (primers) utilizadas no experimento foram definidas a partir do segmento ITS-2 de *Caenorhabditis elegans* (Genebank no X03680) (Ellis *et alii*, 1986) e denominadas ITS-2A: TTAGTTTC'TTTTC'TCCGCT e ITS-2B: TGAAATTTTGAACGAAT. A solução 1 (master-mix) utilizou: 5 µl de tampão diluidor de Taq DNA polimerase 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,4 / 50 mM KCl / 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl (200 µM) de cada desoxirribonucleotídeo (dT, dC, dG e dA), 5 µl (1 µM) de ITS2-A e, 5 µl (1 µM) de ITS2-B.

Da solução 1 foram aliqüotados 19 µl para cada tubo de

reação. A este volume somaram-se 1 µl da amostra a ser testada (exceto no tubo de controle negativo, no qual este volume fora substituído por água deionizada estéril), 29,5 µl de água deionizada estéril (30,5 µl no controle negativo) e 50 µl de óleo mineral. Além do controle negativo, incluímos entre as amostras a serem testadas, extratos de DNA de *Schistosoma mansoni*, *Ascaridia numidae* e de larvas de Cyathostominae como grupos externos. Foi incluído também, amostra de DNA de *Caenorhabditis elegans*, como controle positivo. Assim, o preparo era levado à termocicladora de DNA (Perkin Elmer Cetus 4800), estabelecendo primeiramente uma partida quente (98 °C / 2 min.) e repouso a 94 °C pelo tempo necessário para colocação da enzima Taq DNA polimerase (0,5 µl para cada tubo - 2,5 unidades / Perkin Elmer). Logo após iniciavam-se os ciclos termais: Desnaturação a 94 °C por 1 min.; Anelamento a 55 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min., num total de 30 ciclos.

**Eletroforese dos produtos de PCR:** Analisamos 20% do volume dos produtos de PCR (10 µl) corados pelo tampão de carregamento 6x e submetidos a eletroforese em gel de agarose nas seguintes condições de corrida: 87 volts,  $\approx$  140 mA, durante 70 minutos, em gel de agarose 2,0% corado pelo brometo de etídeo (0,5 µg / µl) utilizando tampão borato-EDTA (TBE) 1X, e como padrão de peso molecular DNA do bacteriófago  $\Phi$ X 174 RF digerido com a enzima *Hae* III. A visualização era feita por transiluminação do gel por radiação ultravioleta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das necrópsias realizadas no campus da UFRRJ foram recuperados 102 espécimes adultos de *S. vulgaris* (70 fêmeas e 32 machos) e 23 da espécie *S. edentatus* (15 fêmeas e 8 machos). Daqueles procedentes de Londrina, 31 foram identificados como *S. equinus* (16 fêmeas e 15 machos), 288 como *S. edentatus* e 56 como *S. vulgaris* (48 fêmeas e 8 machos).

As larvas cultivadas foram assim identificadas: Em 10 amostras somente larvas de Cyathostominae, em 2, larvas de Cyathostominae e *S. vulgaris*, e em 1 larvas de Cyathostominae, de *S. vulgaris* e de *S. equinus*. As quantidades obtidas dos sedimentos variaram de 2.500 a 137.500 larvas.

Como resultado da extração de DNA genômico revelaram-se em gel de eletroforese, bandas em torno de 21.000 pares de bases, compatíveis com moléculas de DNA de alto peso molecular (Figura 1).

Através da reação em cadeia da polimerase, obtivemos produtos amplificados de seqüências de DNA com cerca de 240 pares de bases para as amostras oriundas do gênero *Strongylus*, já demonstrado anteriormente para produtos amplificados de strongilídeos da Austrália (CAMPBELL *et alii*, 1995). Nossos dados ampliaram as informações ao demonstrarem com esta análise a presença de produtos

amplificados com pesos moleculares semelhantes em extratos de DNA oriundos de larvas de Cyathostominae, e a ausência em *S. mansoni* e *A. numidae*, incluídos como controles negativos por se tratarem de grupos externos. Obtivemos amplificação de igual seqüência em DNA genômico de *C. elegans* (controle positivo), o que demonstra a confiabilidade dos resultados (Figura 2).

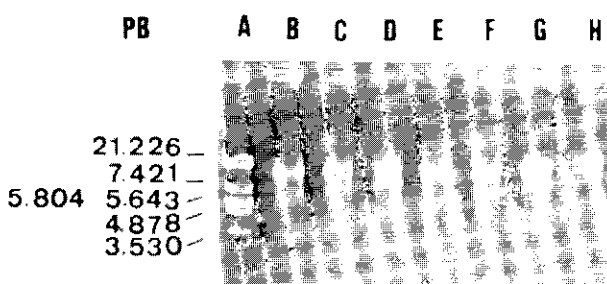


Figura 1 - (Eletroforese de DNA genômico): A- Marcador de peso molecular I DNA/Eco RI; B- *Ascaridia numidae*; C- *Shistosoma mansoni*; D- L3 de Cyathostominae; E- *Strongylus edentatus*; F- *S. equinus*; G- *S. vulgaris*, e H- *Caenorhabditis elegans*. PB- Pares de bases.

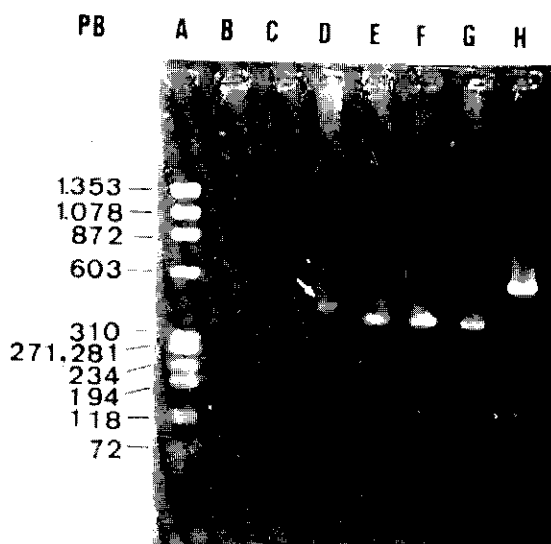


Figura 2 - (Eletroforese de produtos de PCR): A- Marcador de peso molecular  $\Phi$ X 174 RF DNA/*Hae* III; B- *Ascaridia numidae*; C- *Shistosoma mansoni*; D- L3 de Cyathostominae; E- *Strongylus edentatus*; F- *S. equinus*; G- *S. vulgaris*, e H- *Caenorhabditis elegans*. PB- Pares de bases.

Dadas as mínimas variações em termos de peso molecular dos produtos amplificados a partir das seqüências ITS-2 de rDNA para as três espécies pertencentes ao gênero *Strongylus*, as perspectivas de aplicabilidade desta metodologia para a análise espécie-específica quer seja de vermes adultos, ovos ou larvas possivelmente implicará no emprego da análise da extensão do polimorfismo dos fragmentos de DNA, obtidos pela digestão dos produtos de PCR, com enzimas de restrição (RFLP-PCR) (GASSER *et alii*, 1994).

Em adição, a clonagem e o sequenciamento de possíveis seqüências repetitivas de DNA com a elaboração de novos "primers" para serem utilizados em reações de PCR, poderá se revelar numa ferramenta promissora para identificação rápida e precisa de *Strongylus spp.*, uma vez que as já definidas não apresentam especificidade quanto aos gêneros de estrongilídeos estudados.

## SUMMARY

In the present study the second internal transcribed spacer (ITS-2) of the ribosomal DNA from *Strongylus spp.* was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Comparisons were established for the amplification products from related organisms aiming to develop a methodology that might allow a specific diagnosis of these nematode parasites. The amplification of genomic DNA from adult worms and larvae with primers based on the ITS-2 sequence from *Caenorhabditis elegans* resulted in products with 240 base pairs. No DNA amplification was observed when genomic DNAs from *Schistosoma mansoni* and *Ascaridia numidae*, organisms considered outgroups, were included. Our data reveal a potential application of this methodology for the diagnosis of these parasites, although additional studies will be needed towards the definition of species-specific primer sequences.

KEY WORDS: *Strongylus*, species identification, ITS-2, RFLP-PCR, Diagnosis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores e técnicos do Curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, aos Professores Milton Yamamura e Elena Mettifogo da UEL - PR, aos técnicos do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura por facultarem a obtenção dos nematóides utilizados neste estudo. Ao Dr. Carlos E. Winter da USP pelo fornecimento de DNA genômico de *C. elegans*. À Técnica Érika Veríssimo Villela, da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pela colaboração durante os procedimentos relativos a eletroforese das amostras.

## REFERÊNCIAS

- BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. & CONCORDET, D. (1983). Identification of infective larvae of some common nematode strongylids of horses. *Revue de Médecine Veterinaire* 144(12): 989-995.
- CAMPBELL, A. J. D.; GASSER, R. B. & CHILTON, N. B. (1995). Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *International Journal for Parasitology*, 25 (3): 359 -365.
- DAME, J. B.; YOWELL, C. A.; COURTNEY, C. H. & LINDGREN, G. (1991). Cloning and characterization of the ribosomal RNA gene repeat from *Ostertagia ostertagi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45: 275 - 280.
- ELLIS, R. E.; SULSTON, J. E. & COULSON, A. R. (1986). The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 14: 2345-2364.
- GASSER, R. B.; CHILTON, N. B.; HOSTE, H. & STEVENSEN, L. A. (1994). Species identification of Trichostrongyle nematodes by PCR-Linked RFLP. *International Journal for Parasitology*, 24 (2): 291 - 293.
- GASSER, R. B.; CHILTON, N. B.; HOSTE, H. & BEVERIDGE, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research*, 21 (10): 2525 - 2526.
- GORDON, H. MCL & WHITLOCK, A. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Council Scientific Industrial Research Australia*, 12 (1): 50 - 59.
- HERD, R. P. (1990). The changing world of worms: The size of the cyathostomes and the decline of *Strongylus vulgaris*. *Compendium for Continual Education Practical Veterinary*, 12: 732 - 736.
- HOSTE, H.; CHILTON, N. B.; GASSER, R. B. & BEVERIDGE, I. (1995). Differences in the Second Internal Transcribed Spacer ( Ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *International Journal for Parasitology*, 25 (1): 75 - 80.
- LICHTENFELS, J. R. (1975). Helminths of domestic equids. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 42: special issue; 92 pp.
- MCGRAW, B.M. & SLOCOMBE, J.O.F. *Strongylus vulgaris* in the horse: A review. *Canadian Veterinary Journal* 17(6):150-157. 1976.
- NICHOL, C. & MASTERSON, W. J. (1987). Characterisation of surface antigens of *Strongylus vulgaris* of potential immunodiagnostic importance. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, 56: 323 - 328.
- ROBERTS, F. H. S. & O'SULLIVAN, P. J. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1 (1): 99 - 102.
- RODRIGUES, M. L. A.; SOUTO-MAIOR, M. P.; ANJOS, D. H. S. & OLIVEIRA, M. D. L. (1995). Comparação entre técnicas de McMaster e centrifugo flutuação para contagem de ovos de helmintos intestinais de equinos. *Revista da Universidade Rural, série Ciências da Vida* 17 (2): 101-102.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

SOULE, C.(1990). Update on the serological diagnosis of parasitoses in horses. *Pratique Vétérinaire Equine* 21: 7 - 10.

SOULSBY, E. J. L. (1982). Helminths, arthropods & of domesticated animals. 7th Edition, William & Wilkins Co., Baltimore, XIV+824p.

STEVENSON, L. A.; CHILTON, N. B. & GASSER, R. B. (1995). Differentiation of *Haemonchus placei* from *H. contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) by the Ribosomal DNA Second Internal Transcribed Spacer. *International Journal for Parasitology*, 25 (4): 483 - 488.

ZARLENGA, D. S., LICHTENFELS, J. R. & STRINGFELLOW, F. (1994)Cloning and sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene from *Nematodirus battus*. *Journal of Parasitology*, 80 (2): 342-344.

(Received 01 November 1996, Accepted 06 March 1997)