

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**PCR EN TIEMPO REAL PARA EL SEGUIMIENTO
POST-TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR
*Strongyloides stercoralis***

Ferrandini, Paula Julieta – LU 1090033

Lic. Biotecnología

Tutor:

Risso, Marikena- IMPaM

Co-Tutor:

Perez, Adriana Alicia-UADE

22/08/2022



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA
EMPRESA**

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora, Marikena, quien desde el primer día que llegué al laboratorio me guio y ayudó en cada paso, en cada ensayo que realizamos (los cuales tuvimos que repetir incontables veces) y siempre estuvo presente respondiendo cada una de mis dudas.

También quiero agradecer a la Picho, Pau, Esty y Margarita, investigadoras del laboratorio, quienes también me brindaron mucha ayuda y apoyo a lo largo del desarrollo de mi tesis. Siempre estuvieron presentes, desde el planteo de los objetivos hasta la corrección del escrito, para que este trabajo avance con éxito.

Como dicen, la vida con amigos es más fácil, y yo puedo decir que es verdad. Mi camino por la facultad fue más lindo gracias a Mica y Huarte, mis compañeras y amigas desde el primer día de facultad. No hubiera sido lo mismo sin ellas y agradezco a la vida por haberlas puesto en mi camino.

También quiero agradecer a mi familia, en especial a mi mamá, quien me apoyó durante toda la carrera, me bancó en cada llanto por estrés y festejó conmigo cada alegría por haber aprobado un parcial.

Por último, a mi novio Manu, a quien le conté sobre este trabajo desde nuestra primera cita, y me escuchaba con entusiasmo, aunque sin entender nada. Nunca me dejó bajar los brazos y siempre me recordó mi capacidad para lograr todo lo que me proponga.

A todos ustedes, muchas gracias por creer en mí, hacer de esta etapa de mi vida más linda y dejarme disfrutarla con ustedes.

Pau.

Resumen

Strongyloides stercoralis es un geohelminto causante de una parasitosis intestinal conocida como estrongiloidiasis. Esta es frecuente en zonas tropicales y subtropicales de países en desarrollo donde la higiene y las condiciones sanitarias son deficientes. En Argentina, se considera endémica en el norte del país. La incidencia de casos no se conoce con precisión debido a la baja sensibilidad de los métodos de diagnóstico que se aplican de rutina en los laboratorios clínicos. El método convencional es la visualización en microscopio de larvas presentes en materia fecal fresca o fijada, mientras que en laboratorios especializados se realizan cultivo en placas de agar y PCR de punto final, técnicas de mayor sensibilidad.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son principalmente intestinales y respiratorias, observándose con menor frecuencia manifestaciones cutáneas. En pacientes inmunocomprometidos pueden desarrollarse hiperinfecciones, con alta tasa de mortalidad.

Actualmente, el tratamiento para la estrongiloidiasis en todas sus formas clínicas es la ivermectina. Si bien en la literatura se define la cura como la ausencia de larvas en los exámenes parasitológicos luego de un año de administrado el fármaco, en nuestro laboratorio se observaron reactivaciones de la infección en pacientes que fueron controlados por periodos de tiempo más prolongados y que no regresaron a regiones endémicas, detectando ya sea la presencia de larvas en muestras de materia fecal (reactivación parasitaria) y/o el aumento del nivel de eosinófilos en sangre (reactivación clínica). Asimismo, en nuestro laboratorio observamos que en estos pacientes la PCR de punto final permanece indefinidamente positiva en el periodo postratamiento. Esto revela la necesidad de contar con técnicas de laboratorio que permitan obtener información cuantitativa, más adecuadas para realizar el seguimiento evitando de esta manera la progresión hacia formas severas de la enfermedad al retomar el tratamiento farmacológico tempranamente.

En el presente estudio se optimizó una PCR en tiempo real (qPCR) para la detección específica de ADN de *S. stercoralis* en muestras fecales con el objetivo cuantificar la carga parasitaria, asociarla con la evolución postratamiento de los pacientes y utilizarla como método de seguimiento. Se determinó el límite de detección y se utilizó una amplia gama de muestras control para conocer su especificidad. Además, se estableció un control interno de

amplificación a base de un plásmido pZErO-2 que contiene una secuencia de *Arabidopsis thaliana*, el cual también permitió evaluar la presencia de posibles inhibidores de la amplificación por PCR presentes en la materia fecal. Se analizaron muestras de pacientes, en 3 tiempos: T0 (momento del diagnóstico inicial), T1 (3 meses post tratamiento) y T2 (un año post tratamiento).

Durante el trabajo experimental se presentaron diversas dificultades que no permitieron asegurar una cuantificación certera, por lo que se decidió reportar los resultados de manera cualitativa. La técnica de qPCR fue útil para detectar reactivaciones parasitarias de la infección aun en pacientes que en los exámenes parasitológicos convencionales habían arrojado resultados negativos. Por el contrario, la qPCR fue negativa en casos de reactivaciones clínicas.

La qPCR sería una herramienta valiosa para detectar tempranamente reactivaciones parasitarias de la infección, especialmente para el seguimiento de pacientes inmunocomprometidos, quienes pueden desarrollar formas severas de la estrongiloidosis y ser fatales.

Abstract

Strongyloides stercoralis is a geohelminth responsible for causing an intestinal parasitosis known as strongyloidiasis. It is frequent in tropical and subtropical areas in developing countries where hygiene and sanitary conditions are deficient. In Argentina, it's considered endemic in the north of the country. The incidence of cases is not known with precision given the low sensitivity of the diagnostic methods used as a routine in the laboratories. The gold standard method is the microscopic visualization of the larvae present in the stool, fresh or fixed, whereas in specialized laboratories agar plate culture and PCR are used, more sensitive techniques.

The clinical manifestations of the disease are mainly intestinal and respiratory, with less frequent cutaneous manifestations. Hyperinfections can develop in immunocompromised patients, with a high mortality rate.

Currently, the treatment for strongyloidiasis in all its clinical forms is ivermectin. Although in the literature cure is defined as the absence of larvae in parasitological examinations after one year of administering the drug, in our laboratory reactivations of the infection were observed in patients who were controlled for longer periods of time and who did not they returned to endemic regions, detecting either the presence of larvae in fecal samples (parasitic reactivation) and/or an increased level of eosinophils in the blood (clinical reactivation). Likewise, in our laboratory we observed that in these patients the endpoint PCR remains indefinitely positive in the post-treatment period. This reveals the need for laboratory techniques that allow quantitative information to be obtained, more suitable for monitoring, thus avoiding progression to severe forms of the disease when pharmacological treatment is resumed early.

In the present study, a real-time PCR (qPCR) was optimized for the specific detection of *S. stercoralis* DNA in fecal samples with the aim of quantifying the parasite load, associating it with the post-treatment evolution of the patients, and using it as a follow-up method. The detection limit was determined and a wide range of control samples were used to determine their specificity. In addition, an internal amplification control was established based on a pZER0-2 plasmid that contains a sequence from *Arabidopsis thaliana*, which also allowed evaluating the presence of possible PCR amplification inhibitors present in fecal matter. We

analyzed patients in 3 times: T0 (time of initial diagnosis), T1 (3 months post treatment) and T2 (one year post treatment).

During the experimental work, several difficulties arose that did not allow to ensure an accurate quantification, so it was decided to report the results qualitatively. The qPCR technique was useful for detecting parasitic reactivations of the infection even in patients who had shown negative results in conventional parasitological examinations. In contrast, qPCR was negative in cases of clinical reactivation.

This qPCR would be a valuable tool for early detection of parasitic reactivations of the infection, especially for the follow-up of immunocompromised patients, who can develop severe forms of strongyloidiasis and be fatal.

Contenido

| | |
|--|-----------|
| Tabla de abreviaturas | 8 |
| 1. Introducción | 10 |
| 1.1 El parásito..... | 10 |
| 1.2 El ciclo biológico y la infección..... | 10 |
| 1.3 Epidemiología | 12 |
| 1.4 Inmunología de la Estorngiloidiasis..... | 15 |
| 1.5 Manifestaciones Clínicas | 15 |
| 1.6 El diagnóstico de laboratorio | 17 |
| 1.7 El tratamiento..... | 21 |
| 2. Objetivos | 23 |
| 3. Hipótesis | 23 |
| 4. Materiales y Métodos | 24 |
| 4.1 Admisión de pacientes | 24 |
| 4.2 Diagnóstico convencional de <i>S. stercoralis</i> | 25 |
| 4.2.1 Microscopía..... | 25 |
| 4.2.2 Cultivo en placa de agar | 26 |
| 4.2.3 PCR convencional | 26 |
| 4.3 Obtención de larvas de <i>S. stercoralis</i> | 27 |
| 4.4 Extracción de ADN..... | 27 |
| 4.5 Curva estándar para cuantificación | 29 |
| 4.6 PCR en tiempo real (qPCR) | 30 |
| 4.7 Validación analítica del ensayo de qPCR..... | 31 |
| 4.8 Control Interno de amplificación | 32 |
| 4.8.1 Preparación de bacterias competentes | 32 |
| 4.8.2 Transformación de bacterias competentes | 32 |
| 4.8.3 Miniprep de ADN plasmídico | 33 |
| 4.8.4 Digestión del plásmido | 34 |
| 4.9 Análisis de datos | 34 |
| 5. Resultados | 35 |
| 5.1 Optimización de la qPCR | 35 |
| 5.2 Curva estándar para determinación de carga parasitaria..... | 39 |
| 5.3 Determinación de la sensibilidad analítica..... | 40 |
| 5.4 Especificidad de la reacción | 41 |
| 5.5 Control Interno de amplificación | 41 |
| 5.6 Pruebas del Control interno | 43 |
| 5.7 Control de calidad de ADN extraído de muestras de pacientes | 48 |
| 5.8 Determinación de <i>S. stercoralis</i> en muestras de pacientes..... | 51 |
| 6. Discusión | 55 |
| 7. Conclusiones | 59 |
| 8. Bibliografía | 60 |

Tabla de abreviaturas

- °C: grados celsius
- µg: microgramos
- µl: microlitros
- µm: micrómetros
- µM: micromolar
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- BSA: albúmina de suero bovino
- C1: cluster 1
- C2: cluster 2
- CAN: Cultivo en Agar Nutritivo
- Ct: ciclo umbral (*cycle of threshold*)
- Ct: Cycle of threshold
- dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
- DO: Densidad óptica
- ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción
- F: Fresco
- gr: gramo
- HP: haplotipo
- hs: horas
- HTLV-1: Virus Linfotrópico Humano de células T tipo 1
- IAC: Control interno de amplificación (*interal amplification control*)
- kg: kilogramos
- LB: medio Luria-Bertani
- mf: materia fecal
- MgCl₂: Cloruro de magnesio
- min: minutos
- ml: mililitros
- mm: milímetros
- mM: milimolar
- N/E: no ensayado
- ND: no detectable
- ng: nanogramo
- nM: nanomolar
- NTC: Control negativo, sin molde (*No template control*)

- p/v: peso/volumen
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- rpm: revoluciones por minuto
- s: segundos
- S: Seriado
- SDS: dodecilsulfato sódico
- SIHI: Síndrome de Hiperinfección
- T0: momento del diagnóstico
- T1: 3 meses post – tratamiento, aproximadamente
- T2: 1 año post – tratamiento, aproximadamente
- TE: Tris EDTA
- U: Unidad
- UBA: Universidad de Buenos Aires
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. Introducción

1.1 El parásito

Strongyloides stercoralis es un helminto causante de la infección conocida como estrongiloidiasis, una parasitosis intestinal. Pertenece al filo de los nematodos, clase Secernentea, orden Rhabditida, familia Strongyloididae, género *Strongyloides*. Dentro de este género, a su vez, existen aproximadamente 50 especies de parásitos que infectan aves, reptiles, anfibios y mamíferos, entre los cuales encontramos humanos, perros y roedores (Grove, 1996). Se conocen dos especies causantes de la infección en humanos: *Strongyloides stercoralis* y *Strongyloides fuelleborni* (Schär *et al.*, 2013). Ambos son enteroparásitos, que se alojan en la mucosa del intestino delgado, principalmente en el duodeno y yeyuno. En nuestra región, sólo encontramos a *S. stercoralis* como agente infeccioso de humanos, mientras que *S. fuelleborni* se encuentra principalmente en África (Olsen *et al.*, 2009). Los parásitos del género *Strongyloides* presentan un sistema digestivo, nervioso y reproductivo, así como también órganos diferenciados. Tienen un desarrollo complejo que comprende estadios larvarios entre el huevo y el parásito adulto (Farreras y Rozman, 1988).

1.2 El ciclo biológico y la infección

Conocer y entender el complejo ciclo de vida de *S. stercoralis* (Figura 1) permite comprender en qué forma se produce el contagio, qué órganos pueden afectarse y qué muestras es conveniente tomar para realizar las pruebas diagnósticas (Farreras y Rozman, 1988).

El ciclo es *heterogónico*, dado que alterna entre ciclos parasitarios y de vida libre, característica que lo hace más complejo que el de los demás nematodos (Nutman, 2017). El ciclo además es *directo*, dado que los parásitos infectivos no necesitan de huéspedes intermediarios, sino sólo del huésped definitivo. Por otro lado, los parásitos de vida libre se

desarrollan fuera del hospedero (Groove, 1996). Si bien el huésped en la mayoría de los casos es el humano, siendo éste un parásito antropófilo, cabe destacar que esta especie del género *Strongyloides* puede infectar también a perros, gatos y primates no humanos (Sanpool *et al.*, 2020).

En el ciclo de vida de *S. stercoralis* (Figura 1), las larvas filariformes ingresan por vía cutánea. Debido a que estas larvas infectivas secretan metaloproteasas que catalizan la degradación de la matriz extracelular de la piel, logran penetrarla (Groove, 1996) y migran a través de la epidermis hasta ingresar al torrente sanguíneo, llegando al corazón. Traspasan a los pulmones, llegando a los alvéolos atravesando la barrera alvéolo capilar (Núñez *et al.*, 2019). Una vez allí, las larvas ascienden por el árbol traqueobronquial y laringe, llegando a la faringe, donde son deglutidas. De esta manera, alcanzan el esófago y, finalmente descenden hasta alcanzar el intestino delgado, penetrando la mucosa, especialmente en el duodeno y yeyuno (Greaves *et al.*, 2013). Este ciclo se conoce como *Ciclo de Loos*. Otra hipótesis señala que las larvas migrantes en la piel alcanzan el duodeno, desplazándose por el tejido subcutáneo (Carrada-Bravo *et al.*, 2008).

Una vez dentro de la mucosa del intestino delgado, se transforman en parásitos hembra adultos en un plazo de aproximadamente dos semanas. Estas se reproducen en ausencia del macho por partenogénesis, una forma de reproducción asexual que consiste en la generación de huevos que contienen células sexuales femeninas (óvulos) no fecundadas que desarrollan hasta formar embriones completos, los cuales tendrán el mismo material genético de su progenitora (Neva, 1986). Los huevos eclosionan en el epitelio del intestino delgado y dan origen a larvas rabditoides, no infecciosas, que migran hacia el lumen y son eliminadas con las heces, generalmente a la tercera o cuarta semana desde el inicio de la infección (Núñez *et al.*, 2019). Si las condiciones del suelo no son las adecuadas, las larvas rabditoides se diferencian a filariformes, las cuales tienen 48 hs para ingresar al hospedero (Groove, 1996). Algunas larvas rabditoides que pasan de la materia fecal a la tierra, debido a su genética y otros factores ambientales, se diferencian a adultos de vida libre machos y hembras, que se reproducen sexualmente (Toledo *et al.*, 2015).

El ciclo de autoinfección se caracteriza porque las larvas rabditoides se diferencian en filariformes autoinfectantes en la luz intestinal o piel perianal y penetran por la mucosa

hacia el torrente sanguíneo e inician nuevamente el ciclo del parásito (Vadlamudi *et al.*, 2006). Este mecanismo favorece la persistencia parasitaria muchos años después de la primoinfección y permite el establecimiento de la etapa crónica de la infección (Spotin *et al.*, 2019).

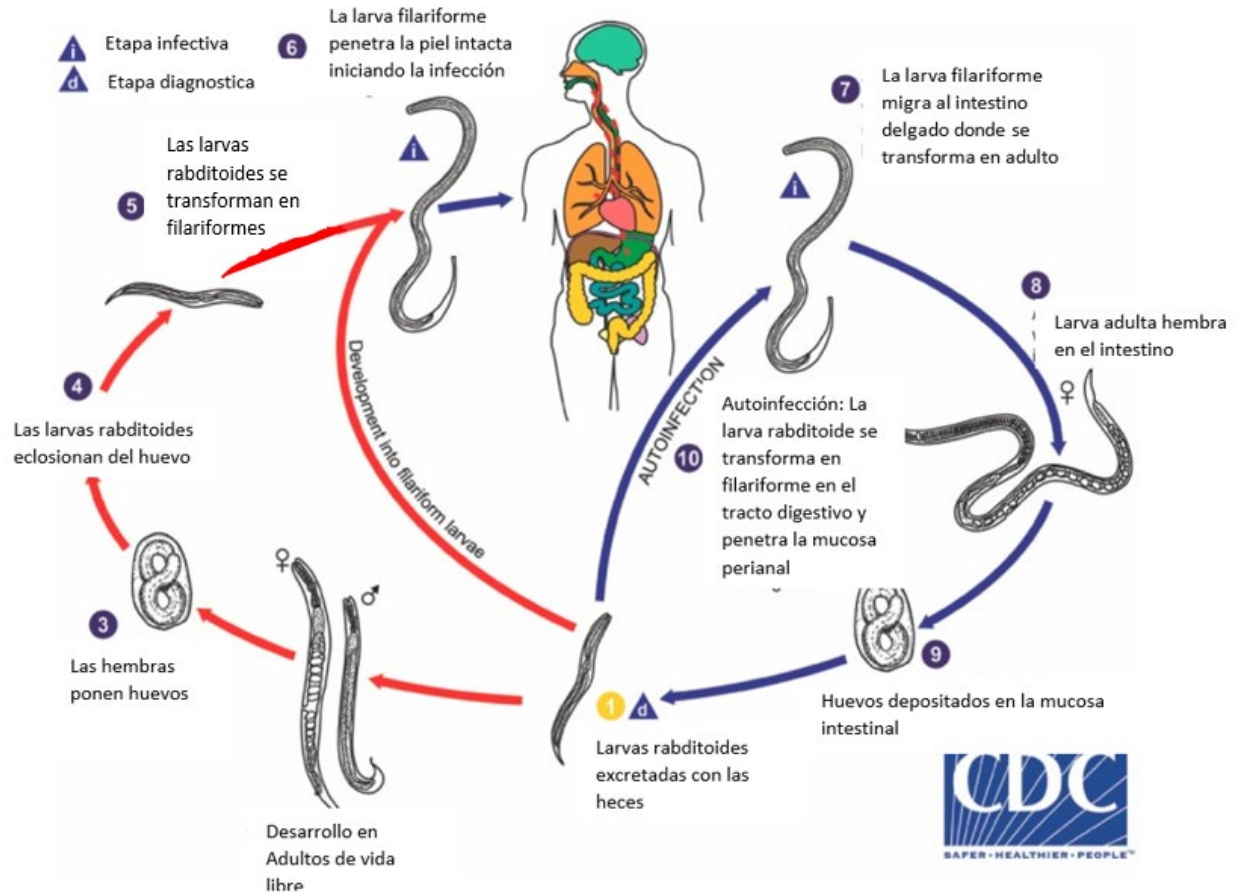


Figura 1: Ciclo de vida de *S. stercoralis*. Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/>

1.3 Epidemiología

La distribución geográfica de un parásito depende de dos factores principales: de la presencia de hospedadores adecuados, y de los hábitos y condiciones ambientales, que hagan posible el paso de un huésped a otro (Musto, 2013). Las enfermedades parasitarias están estrechamente vinculadas con el nivel de desarrollo humano y la calidad de vida de las

distintas comunidades. Además, factores genéticos propios del parásito, como mutaciones casuales que pueden sufrir, tienden a modificar su distribución a largo plazo, por ejemplo, adquiriendo resistencia a ciertas condiciones ambientales. *Strongyloides stercoralis* presenta una distribución mundial, con mayor prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, con climas cálidos y suelos húmedos de tipo arenoso, condiciones favorables para las formas de vida libre de este parásito (Olsen *et al.*, 2009).

Por otro lado, la distribución de los parásitos está directamente relacionada con factores individuales de los huéspedes, como factores genéticos y epigenéticos, grupo etario, sexo y estado inmunológico, que derivan en distintos grados de susceptibilidad y resistencia (Paula y Costa Cruz, 2011).

La estrongiloidiasis es más frecuente en países en desarrollo, donde la higiene y las condiciones sanitarias son deficientes. Algunos factores que favorecen esta enfermedad son la carencia de sistemas de agua potable y cloacas, urbanización deficiente y contacto frecuente con animales (Hall *et al.*, 1994). La contaminación fecal de tierra o agua y las deficientes condiciones de viviendas y acumulación de basura son los factores más importantes en la diseminación de los parásitos ya que permiten que las larvas se diferencien y lleguen a ser infectantes. También la ausencia de información sobre transmisión y prevención favorece la persistencia de *S. stercoralis*. Es por este motivo que los individuos más afectados son aquellos con menos recursos económicos, siendo una importante causa de mortalidad y morbilidad cuando confluyen los factores previamente mencionados (Beknazarova *et al.*, 2016).

A pesar de su alta importancia a nivel clínico, la estrongiloidiasis es considerada una de las “Enfermedades Tropicales Desatendidas”. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) “*estas enfermedades reciben atención insuficiente y se ven postergadas en las prioridades de la salud pública porque los afectados carecen de influencia política*” (OMS, 2017). Por esto, es de suma importancia la correcta utilización de los recursos para lograr mejores condiciones ambientales, particularmente en las áreas de mayor impacto de esta enfermedad.

Se estima que entre 300 y 400 millones de personas están infectadas con *S. stercoralis* mundialmente (Schär *et al.*, 2013). De todas formas, estos valores pueden ser subestimados

debido a la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos (Montes *et al.*, 2010) y la falta de información a nivel mundial. Las zonas con mayor prevalencia parasitaria son América Latina (en áreas rurales y marginales), el Sureste Asiático y África tropical (Greaves *et al.*, 2013). En Argentina, las infecciones por helmintos son consideradas endémicas en el norte del país, donde las condiciones climáticas y sociales son óptimas para su propagación.

En nuestro país, las áreas de mayor frecuencia de casos de *S. stercoralis* corresponden al Noreste y Noroeste del país con una variación de prevalencia (analizada en 5495 individuos en total de 8 provincias, entre 1980 y 2011) de 0 a 83% encontrando los principales focos en Misiones, Chaco, Formosa y Salta (Socías *et al.*, 2014). Existe además una tendencia descendente de la prevalencia de estas parasitosis de norte a sur y de este a oeste asociadas a la variabilidad climática y socioeconómica del país (Navone *et al.*, 2017). Por otro lado, en el Laboratorio de Parasitología Clínica y Molecular del IMPaM hemos realizado entre 2009 y 2013 un estudio prospectivo, descriptivo y observacional de esta parasitosis en pacientes oriundos de 11 provincias de Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires) que no regresaron en los años previos al estudio ni durante el mismo a área endémica y fueron evaluados en el consultorio de Parasitología de la División Infectología del Hospital de Clínicas José de San Martín (UBA) por signos o síntomas compatibles con esta parasitosis. En este estudio se describió una frecuencia de 30% de casos positivos, con el mayor número de casos correspondientes a las provincias de Misiones y Corrientes (Repetto *et al.*, 2016).

Los mecanismos para prevenir la estrongiloidiasis son muchos y comprenden varios aspectos. En primer lugar, es de suma importancia hacer hincapié en un mejoramiento general de las condiciones de vida de las poblaciones más afectadas. La infección se previene evitando el contacto de la piel con larvas infectantes presentes en la tierra, por lo que se debe evitar caminar descalzo. La adecuada higiene personal y del ambiente ayuda a reducir el riesgo de contraer estrongiloidiasis, así como también otras geohelminthiasis (Izquierdo *et al.*, 2013). Las instituciones de salud pública y sanitarias deben brindar un buen control de la infección, sobre todo en los grupos de riesgo, de manera de detectar precozmente la infección, realizar un diagnóstico preciso y administrar el tratamiento adecuado.

1.4 Inmunología de la estrogiloidiasis

La capacidad del parásito de persistir en el hospedero depende del equilibrio que se establezca con los mecanismos de respuesta inmune que el hospedero ponga en marcha para eliminarlo. De este equilibrio, surgirá la enfermedad o la infección asintomática (Musto, 2013).

La respuesta inmune efectora frente a helmintos depende de la activación de LTCD4 Th2 (Bonne-Année et al., 2011). Estos confieren inmunidad mediada por las interleuquinas IL4, IL5, IL9 e IL10, y por IgE, IgG1 e IgA. La IL4 estimula la síntesis de IgE y la IL5 la activación de los eosinófilos. Además, la IL4 estimula el peristaltismo actuando sobre las terminaciones nerviosas colinérgicas del músculo liso de intestino delgado. La IL9 e IL10 estimulan la acumulación de mastocitos en mucosa intestinal, los que liberan mediadores que también activan el peristaltismo y aumentan la secreción mucosa de las células caliciformes (Maruyama *et al.*, 2000; Mulcahy *et al.*, 2004). Las citoquinas inducen quimiotaxis y modulan la actividad de los eosinófilos localmente. Los mastocitos, junto a los eosinófilos y a las células caliciformes son los principales promotores de la expulsión intestinal de los helmintos (Mulcahy *et al.*, 2004).

La respuesta inmune frente a *S. stercoralis* se traduce en el laboratorio del paciente en eosinofilia periférica, la cual constituye un marcador de infección que orienta a buscar esta parasitosis en pacientes con antecedentes epidemiológicos. Sin embargo, en los pacientes inmunocomprometidos o con infección severa esta puede estar ausente, siendo un marcador de mal pronóstico.

1.5 Manifestaciones clínicas

Como todos los helmintos que realizan ciclo de Loos, los órganos diana más importantes son el intestino y el pulmón. Por lo tanto, las manifestaciones clínicas relevantes serán respiratorias (Síndrome de Loeffler) e intestinales (trastornos en el ritmo evacuatorio,

dolor abdominal, íleo paralítico, etc). La severidad del cuadro depende de la carga parasitaria y de la respuesta inmune del hospedero (Toledo *et al.*, 2015).

Existen tres formas clínicas: aguda, crónica y las formas severas (hiperinfección y diseminación) (Vadlamudi *et al.*, 2006).

Las formas agudas se caracterizan por neumonía eosinofílica y diarrea. En los pacientes inmunocompetentes, la eosinofilia asintomática en las formas crónicas es la causa habitual de consulta. También pueden encontrarse manifestaciones gastrointestinales (trastornos en el ritmo evacuatorio y dolor abdominal), prurito y tos (Milder *et al.*, 1981).

Pueden también observarse manifestaciones cutáneas en las infecciones agudas, crónicas y en los pacientes inmunocomprometidos. La “larva currens” son lesiones serpiginosas, eritematosas, en zona perianal, glúteos, tórax, muslos y extremidades inferiores (Mejía y Nutman, 2012). En los pacientes inmunocomprometidos, las lesiones cutáneas purpúricas periumbilicales y en muslos son consecuencias de la migración de la larva a través de los vasos de la dermis.

Las formas severas se deben a la aceleración del ciclo de autoinfección, que incrementa la carga parasitaria tanto en el pulmón como en el intestino (hiperinfección) o por migración hacia órganos fuera del ciclo habitual, por ejemplo cerebro y riñón (diseminación). Esto conduce a complicaciones bacterianas por microorganismos de la microbiota intestinal debido al transporte de estos en la cutícula de las larvas. Las formas severas alcanzan una mortalidad de hasta 80% (Buonfrate *et al.*, 2013; Keiser y Nutman, 2004). Los factores de riesgo para este cuadro son el uso de inmunosupresores, en especial los glucocorticoides; enfermedades oncohematológicas, desnutrición, alcoholismo, hipogammaglobulinemia, enfermedades autoinflamatorias e infección por el virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1). *S. stercoralis* es altamente prevalente entre los individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Nabha *et al.*, 2012; Marcos *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2012). Estudios en Etiopía mostraron una prevalencia de *S. stercoralis* veintiuna veces mayor en pacientes VIH reactivos que en pacientes VIH no reactivos (Assefa *et al.*, 2009). Sin embargo, este incremento de pacientes con coinfección no se acompaña de una mayor incidencia de formas severas de infección. Esto se debe a que el recuento de LTCD4+ está relacionado en forma inversa con los valores de IgE y eosinófilos y se evitarían así las formas

severas de hiperinfección (Viney *et al.*, 2004).

1.6 El diagnóstico de laboratorio

El método de referencia para el diagnóstico de la estrongiloidiasis es la observación de las larvas rhabditoides en materia fecal (Verweij *et al.*, 2009). Si bien la técnica es rápida y económica, presenta dos inconvenientes. El primero, el requerimiento de personal entrenado para evitar los falsos positivos porque las larvas de *S. stercoralis* son similares a otros nematodos (Tehrani *et al.*, 2019). El segundo, la observación microscópica es una técnica con una sensibilidad del 30% si se analiza una sola muestra porque la eliminación de larvas en heces es escasa y fluctuante en las infecciones crónicas (Ericsson *et al.*, 2001).

Una forma de aumentar la sensibilidad se basa en la observación de muestras seriadas, tomadas en días alternos, ya sea en fresco o conservadas en solución fijadora, de manera de aumentar la probabilidad de detectar liberación de larvas (Knopp *et al.*, 2008). Para aumentar la sensibilidad, la muestra puede ser concentrada por centrifugación, como por ejemplo en el método Ritchie (Figura 2), en el cual la materia fecal fijada en formol al 5% es mezclada con éter y centrifugada eliminando grasas y residuos que estén presentes en la muestra y pueden interferir en la visualización microscópica de parásitos (Von Schiller *et al.*, 2013).

Otro método utilizado es el método Baermann (Javanian *et al.*, 2019). Este se basa en el hidrotropismo y termotropismo del parásito. Consiste en colocar un embudo en el cual se coloca una malla metálica fina cubierta con gasa doble. La materia fecal se deposita sobre ésta y se completa el volumen del embudo con agua tibia. Así las larvas migran desde la materia fecal hacia el agua tibia y se concentran en el fondo del embudo, desde donde se separa la fracción de agua que las contiene. Ese material se observa en el microscopio óptico (Figura 3).

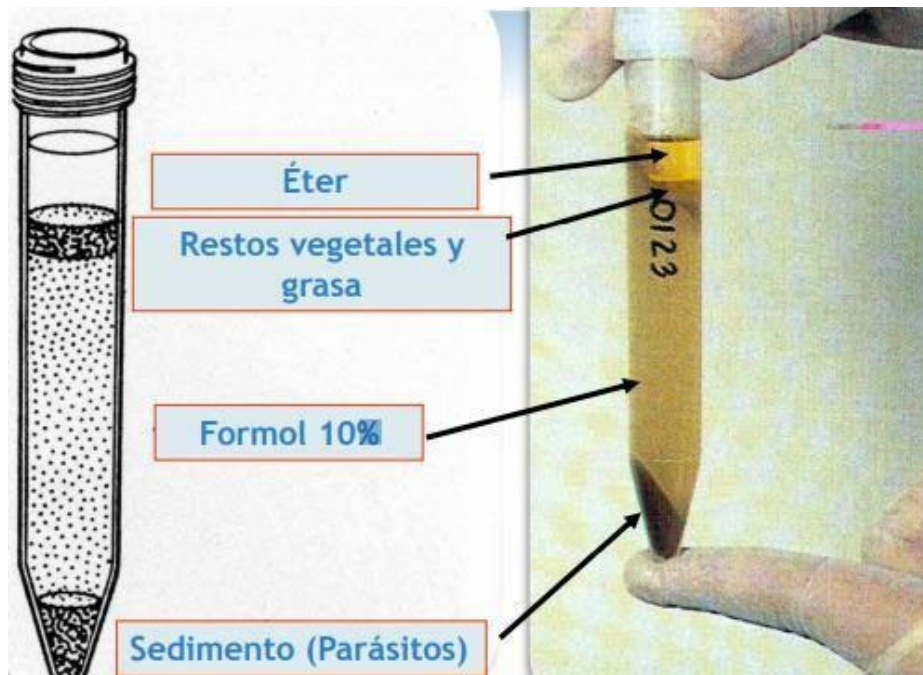


Figura 2: Método de concentración por centrifugación de Ritchie

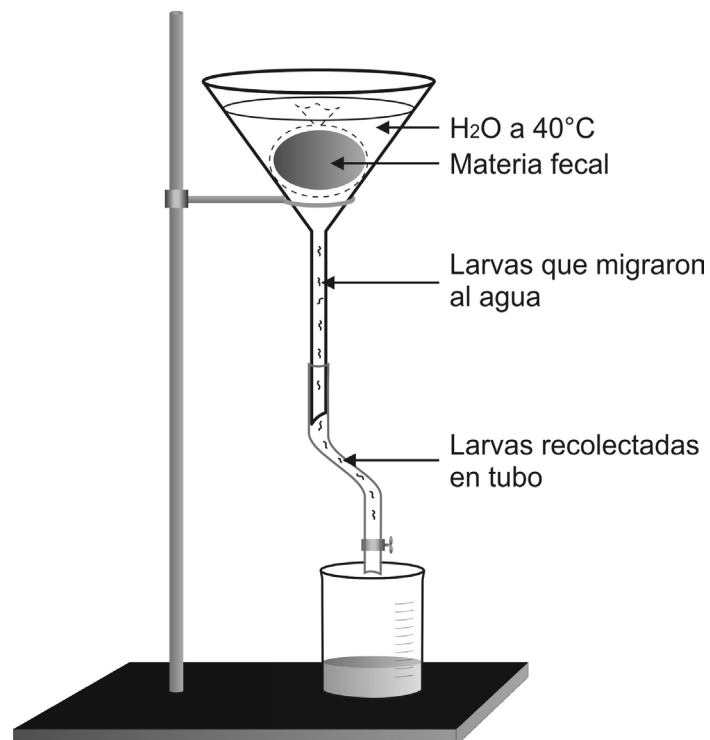


Figura 3: Esquema del método Baermann

El cultivo en placa de agar consiste en colocar 3 gr de materia fecal en el centro de una placa de Petri con agar nutritivo, la cual se incuba 24 hs. Si la muestra contiene larvas de nematodos (uncinarias o *Strongyloides* sp.) se observarán trayectos visibles en el agar debido al desplazamiento de las larvas por la superficie. El trayecto es demarcado por el desarrollo de colonias a partir de bacterias arrastradas en la cutícula de las larvas que migran sobre la superficie del medio de cultivo (Figura 4) (Repetto *et al*, 2010; Requena-Méndez *et al.*, 2013). Si bien la sensibilidad de este método es mayor a la de los mencionados anteriormente, es más costoso y no es completamente específico ya que los trayectos pueden deberse también a la presencia de larvas de uncinarias en la muestra, teniendo que recurrir a la observación de las características morfológicas de las larvas para arribar a su diferenciación. Adicionalmente, en el agar nutritivo las larvas rabditoides pueden diferenciarse en filariformes, lo que representa un problema de seguridad biológica.

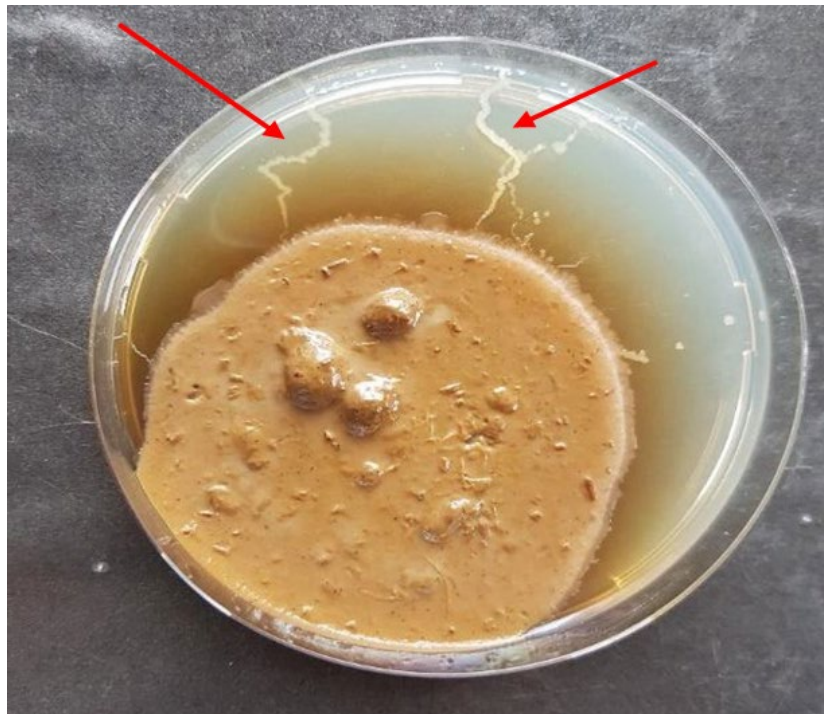


Figura 4: Trayecto típico de *S. stercoralis* sobre placa de agar indicado con flecha roja. Imagen tomada en el Laboratorio de Parasitología Clínica y Molecular, Facultad de medicina, UBA

Los métodos serológicos, en los cuales se busca detectar la presencia de anticuerpos en sangre, también son utilizados con frecuencia. El más común es el ensayo enzimático de inmunoabsorción (ELISA) (Javanian *et al.*, 2019). Sin embargo, este método diagnóstico no es eficiente en pacientes con síndrome de hiperinfección (SIHI) ya que estos presentan bajos títulos de anticuerpos, lo que puede dificultar su detección (Firouzjaee *et al.*, 2018). Además, puede haber reacciones cruzadas con anticuerpos desarrollados frente a infecciones por otros helmintos, dando lugar a falsos positivos. De todas formas, a diferencia de otros países, en nuestra región el diagnóstico de *S. stercoralis* basado en serología no es utilizado debido a la falta de disponibilidad de kits comerciales. Si bien estas técnicas mejoran la sensibilidad respecto de la observación directa en fresco, los niveles alcanzados aún siguen sin ser óptimos.

Esto llevó al desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual permite detectar con alta especificidad material genético del parásito y aumentar significativamente la sensibilidad respecto de la inmunodetección (Javanian *et al.*, 2019). Sin embargo, la PCR también presenta limitaciones tales como falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de la reacción en la materia fecal, así como la escasa obtención de ADN debido a la dificultad que presenta la ruptura de la cutícula de la larva y la consiguiente liberación de ADN. Es por esto que la PCR punto final no es ampliamente utilizada como diagnóstico de certeza, sino que tiene un rol de test complementario a otras técnicas como la microscopía (Buonfrate *et al.*, 2018).

En este contexto, en nuestro laboratorio se realizaron avances significativos para disminuir la obtención de falsos negativos. Las estrategias se enfocaron tanto en la extracción de ADN del parásito, así como también en la estandarización de la PCR. La extracción de ADN se optimizó a partir del agregado de estrategias alternativas para la lisis del parásito, que comprendieron la incubación de las muestras en un buffer de glicina-SDS y la lisis mecánica de las larvas del nematodo. En cuanto a la estandarización de la PCR, esta se optimizó a partir del agregado de albúmina sérica bovina (BSA) para la neutralización de inhibidores presentes en la materia fecal, aumentando significativamente la sensibilidad de la reacción (Repetto *et al.*, 2013). A partir de esta optimización fue posible determinar que en pacientes infectados y tratados con el esquema terapéutico indicado por el sistema de salud la PCR persiste positiva, aun cuando los exámenes parasitológicos son negativos y el paciente ya no presenta síntomas

ni signos clínicos asociados a la infección (Repetto *et al.*, 2013, 2018). Por esta razón, esta PCR cualitativa no puede ser utilizada para detectar reactivaciones.

Debido a la elevada prevalencia de *S. stercoralis* en determinadas regiones, especialmente aquellas con características tropicales, a la hora de llevar a cabo un diagnóstico es importante realizar una historia clínica-epidemiológica del paciente, donde se le pregunte si visitó zonas endémicas, tales como el norte de Argentina o países de Latinoamérica en los que se considera endémica la enfermedad, así como también sobre hábitos que conllevan un riesgo de infección, generalmente relacionados a condiciones socio-sanitarias deficientes asociadas a la pobreza (ausencia de instalaciones sanitarias adecuadas, fecalismo por consumo de agua contaminada, caminar descalzo por falta de calzado, etc.). Esta información clínico-epidemiológica es especialmente importante en pacientes crónicos ya que, ante una inmunosupresión, ya sea por razones naturales, un tratamiento con corticoides, trasplantes, inmunosupresión farmacológica, enfermedades oncohematológicas, se puede desencadenar un síndrome de hiperinfección (Firouzjaee *et al.*, 2018). El diagnóstico precoz de la estrongiloidiasis es de suma importancia para lograr un efectivo control de la enfermedad. Por esto, la introducción de la PCR de punto final como método de alta sensibilidad, complementario a los basados en microscopía y al cultivo en agar nutritivo resulta de gran valor para arribar al diagnóstico de certeza rápidamente (Repetto *et al.*, 2013, 2016). No obstante, este método molecular no es aplicable como técnica de laboratorio para el seguimiento de los pacientes que han sido diagnosticados y tratados, dado que persiste permanentemente positivo en el periodo postratamiento (Repetto *et al.*, 2018). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas herramientas para el seguimiento de los pacientes que permitan detectar posibles reactivaciones de la infección.

1.7 El Tratamiento

Actualmente, la droga de elección para el tratamiento de la estrongiloidosis es la ivermectina, dadas su fácil administración, buena tolerancia y mayor eficacia en comparación con el Tiabendazol y Mebendazol.

La cura parasitológica se define en la actualidad como la ausencia de larvas en materia

fecal al año post tratamiento. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos observado que los pacientes presentan frecuentemente reactivación de la enfermedad, definida por la aparición de síntomas clínicos (reactivación clínica) y/o por la detección directa de larvas en materia fecal (reactivación parasitológica). Esto puede suceder en diferentes momentos luego del tratamiento y en forma independiente del estatus inmune del paciente y de la forma clínica de presentación inicial. La ivermectina es útil para controlar la carga parasitaria inicial pero no logra erradicar totalmente al parásito del hospedero. Uno de los motivos probables es la mayor acción de la ivermectina sobre los estadios adultos del parásito y menor sobre los estadios larvarios. Esto dificulta la erradicación de la infección si se tiene en cuenta el ciclo de Loos en el cual las larvas migran cada dos semanas para llegar finalmente al intestino y diferenciarse a hembras partenogénicas (Repetto *et al.*, 2018).

2. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la asociación entre la reactivación de la estrongiloidiasis en el período post tratamiento y la carga parasitaria en materia fecal medida por PCR cuantitativa (qPCR).

Objetivos específicos

- Estandarizar una qPCR en materia fecal para diagnóstico y seguimiento de pacientes con estrongiloidiasis.
- Generar un control interno de amplificación para el ensayo de qPCR, que valide los resultados obtenidos en cada determinación.
- Evaluar la asociación de la carga parasitaria en materia fecal con la evolución clínica post tratamiento.

3. Hipótesis

En base a lo investigado, la hipótesis planteada es que *“la carga parasitaria en materia fecal de los pacientes tratados por infección con S. stercoralis puede relacionarse con la reactivación de la infección”*.

4. Materiales y Métodos

Existen distintos métodos para determinar por qPCR la cantidad inicial de ADN de interés en una muestra, entre los cuales se encuentran la cuantificación absoluta por curva estándar y la cuantificación comparativa. En este trabajo utilizaremos el método de cuantificación absoluta. Para construir la curva estándar, preparamos diluciones seriadas de ADN obtenido a partir de materia fecal de voluntarios sanos contaminada con un número conocido de larvas de *S. stercoralis*. Estas diluciones se utilizaron como molde para amplificación por qPCR y con los resultados obtenidos se graficó la curva de Ct vs cantidad de larvas. Asimismo, se sometieron a qPCR muestras de pacientes para obtener sus respectivos Ct, interpolarlos en esta curva y determinar la carga parasitaria. Para esto, se llevaron a cabo los procedimientos que se describen a continuación.

4.1 Admisión de pacientes

Este estudio fue realizado en el marco del proyecto “Estrongiloidosis en Argentina: diversidad poblacional de aislamientos de pacientes sin riesgo de reinfección exógena y seguimiento postratamiento” que cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital de Clínicas José de San Martín, dependiente de la Facultad de Medicina (UBA) desde septiembre de 2013 (ver anexo I).

Los pacientes fueron evaluados por la Dra. Silvia Repetto en el consultorio de Parasitología, División Infectología del Hospital de Clínicas José de San Martín. Luego de leer y comprender la información del estudio, tanto los pacientes como los voluntarios sanos que fueron invitados a participar del estudio firmaron un consentimiento informado y se completó un formulario de recolección de datos clínico-epidemiológicos. Las muestras de materia fecal fueron remitidas al Laboratorio de Parasitología Clínica y Molecular del IMPaM, donde se realizó el diagnóstico parasitológico convencional y molecular (PCR punto final). Los pacientes con infección por *S. stercoralis* recibieron gratuitamente ivermectina 200 µg/kg/día (tiempo de tratamiento según cuadro clínico). Se repitió la evaluación de los pacientes mediante

técnicas parasitológicas y moleculares (PCR punto final) entre los 30 días y 60 días post-tratamiento, y luego de 360 días post-tratamiento; a partir de ese momento, la evaluación se realiza cada 3 meses aproximadamente. Las muestras recolectadas durante el período de seguimiento fueron conservadas a -20°C luego de ser analizadas y hasta el momento de realizar este estudio. Si bien estos plazos exceden el período de desarrollo de este trabajo final, el protocolo de controles y toma de muestras para seguimiento post-tratamiento de los pacientes se encuentra avanzado en el laboratorio al momento de la redacción de este documento, ya que corresponde al mismo esquema de seguimiento que afecta a diferentes proyectos desarrollados por el equipo de trabajo, dentro de los cuales se articula este proyecto.

- Criterios de inclusión: pacientes con diagnóstico de estrongiloidiasis, mayores de 18 años.
- Criterios de eliminación: pacientes que estén recibiendo o hayan recibido antiparasitarios o antibióticos hasta 3 meses antes del momento de incorporación al estudio.
- Criterio de exclusión: embarazo.

4.2 Diagnóstico convencional de *S. stercoralis*

4.2.1 Microscopía

Materia fecal recientemente emitida fue homogenizada en agua destilada, filtrada y centrifugada a 1500 rpm durante 10 min. El sedimento fue analizado bajo microscopio óptico (amplificación 10X) en busca de la presencia de larvas.

De manera de aumentar la sensibilidad de la microscopía se aplicaron métodos de concentración Ritchie y Baermann. Para el método Ritchie se filtraron aproximadamente 10 ml de materia fecal fijada en formol al 5% a través de un embudo con doble gasa y se completó el volumen con solución fisiológica alcanzando los 15 ml. Se centrifugó 5 min a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de formol al 5%. Se

agregaron 5 ml de acetato de etilo y luego de homogeneizar por agitación se centrifugó nuevamente. El anillo de grasa formado fue removido con una varilla de vidrio y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue analizado por microscopía óptica.

Para el método Baermann, se colocó una gasa en un embudo conectado a una goma apretada con una pinza (ver Figura 14). Sobre la gasa se depositaron 10 gramos de materia fecal fresca y se añadió agua tibia. Luego de 2 hs se abrió la pinza dejando pasar el agua a un vaso colector. El líquido se centrifugó 5 min a 1500 rpm y el sedimento fue analizado por microscopía óptica.

4.2.2 Cultivo en placa de agar

Tres gramos de materia fecal fresca fueron homogeneizados con agua destilada y sembrados en el centro de una placa con Agar Nutritivo (por triplicado). Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días y fueron examinadas diariamente bajo microscopio en busca de larvas o trayectos correspondientes a la migración de éstas.

4.2.3 PCR convencional

Posteriormente a la extracción de ADN que se describe más adelante (punto 6.4), se llevó a cabo una PCR de punto final amplificando una región conservada de 101 pb del gen codificante para la subunidad menor ribosomal 18S de *S. stercoralis* utilizando los cebadores previamente publicados (Stro 18S-1530F 5' GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC 3' y Stro18S-1630 5'TGCCTCCTGGATATTGCTCAGTTC 3') (Verweij *et al.*, 2009).

Se preparó la master mix en un volumen final de 20 µl según: 0.4 µM dNTPS, 0,01U/µl de polimerasa Taq (Dream Taq, Fermentas), 0.5 µM de cada cebador, 0.1 µg/µl BSA, 3 Mm MgCl₂ y 2 µl de ADN. (Repetto *et al.*, 2013). Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas y como control positivo una muestra de ADN extraído de material fecal de paciente con diagnóstico positivo para *S. stercoralis*.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Swift Maxi (ESCO Global) y constó de un paso inicial de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 95°C (45s), 55°C (1 min) y

72°C (45s) y una elongación final a 72°C (5 min).

Los productos de amplificación fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa 3% (p/v) y detectados con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Las imágenes de los geles fueron capturadas en un fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System (UVP).

4.3 Obtención de larvas de *S. stercoralis*

Las larvas de *S. stercoralis* para preparar la curva estándar para cuantificación fueron obtenidas a partir de cultivos en placas con agar nutritivo de muestras de materia fecal fresca de pacientes con diagnóstico positivo. Luego de 24 horas de cultivo se agregó agua destilada tibia a las placas y luego de una breve incubación a temperatura ambiente se tomaron alícuotas del líquido y se centrifugaron a 2000 rpm para concentrar los parásitos en el sedimento. Se colocaron pequeñas gotas en un portaobjetos y bajo la visualización microscópica, utilizando una micropipeta, se tomaron las larvas individualmente, colocándolas en tubos Eppendorf que se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.4 Extracción de ADN

La extracción y purificación de ADN del parásito requiere la aplicación de métodos adecuados para lograr la lisis celular, extraer eficientemente el ADN preservándolo de la actividad de nucleasas intracelulares y eliminar posibles contaminantes que pudieran interferir en usos posteriores del material obtenido.

La extracción de ADN de *S. stercoralis* fue realizada utilizando el kit ADN PuriPrep-SUELO (Inbio Highway), incorporando un paso de lisis mecánica estandarizado. Para ello, cada muestra de materia fecal (0,2 gr) se colocó en un vial de 2 ml conteniendo buffer y perlas (provisto por el kit) y posteriormente los tubos fueron colocados en nitrógeno líquido durante 10 min, seguidos de 5 min en baño húmedo a 37°C, repitiendo este procedimiento tres veces en total. Luego de una agitación de 30 seg se adicionaron 220 µl de buffer BL y agitó a máxima velocidad durante 10 min. Se centrifugó a 10.000 xg durante 2 min, el sobrenadante se transfirió a tubo de 1,5 ml y se incubó en hielo durante 2 min y se adicionaron 275 µl de buffer BF

mezclando por inversión 3 veces y se realizó una nueva incubación en hielo de 2 min. Se centrifugó a 10.000 xg durante 2 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo al que se le agregaron 425 µl de buffer BB, se mezcló por inversión, se centrifugó 10.000 xg durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se adicionaron 425 µl de etanol (96-100%), se agitó por inversión 3 veces y 650 µl se transfirieron a una minicolumna colocada sobre un tubo colector de 2 ml (provisto). Se centrifugó a 12.000 xg durante 1 min hasta que haya escurrido todo el contenido y luego de descartar el filtrado se realizó un lavado con 500 µl del buffer BLav1, se centrifugó 1 min a 12.000 xg y un segundo lavado con 500 µl de buffer BLav2, se centrifugó nuevamente durante 3 min a 12.000 xg. Finalmente, la elución del ADN se realizó con 100 µl de Buffer TE que luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente se obtuvo mediante una centrifugación de 2 min a 12.000 xg. El ADN obtenido se conservó a -80°C hasta su utilización en los ensayos de PCR y qPCR.

Esta metodología de extracción se aplicó:

- En 5 réplicas, de 50 larvas (separadas como se describió anteriormente) con las cuales se contaminaron 0.2 gr de materia fecal de voluntarios sanos, obteniendo como producto el ADN de 250 larvas en un volumen final total de ADN de 500 µl, utilizados para la construcción de la curva para cuantificación.
- En 6 réplicas, de 0.2 gr de materia fecal de donantes sanos llegando a un volumen final de 600 µl de ADN normal, utilizado para la construcción de la curva para cuantificación y para controles negativos en las reacciones de amplificación.
- A 0.2 gr de materia fecal de pacientes con estrongiloidiasis confirmada. Previo a la extracción se agregaron a cada muestra 2 ng de un plásmido que se utilizó como control interno de amplificación (ver sección 4.8).

La calidad del ADN extraído de estas muestras fue verificada calculando las relaciones de absorbancia a 260/230 nm y 260/280 nm, determinadas en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific).

4.5 Curva estándar para cuantificación

La curva estándar se construyó con cinco puntos representativos de 50 larvas, 10 larvas, 2 larvas, 0.4 larvas y 0.08 larvas de *S. stercoralis* (diluciones sucesivas al quinto de ADN de larvas obtenidas de cultivos, como se describió previamente). Las diluciones sucesivas se realizaron utilizando, en cambio de buffer TE o agua, ADN extraído mediante el protocolo detallado, a partir de materia fecal de voluntarios sanos. Esta corrección permite que todos los puntos de la curva estén afectados de manera similar que las muestras de pacientes por compuestos inhibidores de la actividad de polimerasas de ADN, habitualmente presentes en materia fecal. De esta manera, todos los puntos de la curva se asemejan en cuanto al contenido de dichos inhibidores a las muestras de pacientes a procesar posteriormente, dando validez al cálculo de la carga parasitaria por interpolación en la curva.

Para minimizar las variaciones entre ensayos, se realizó una única extracción de ADN a partir de materia fecal de voluntarios sanos contaminada con larvas obtenidas según lo detallado en la sección 4.3. Con el ADN obtenido se prepararon, en el momento, las diluciones mencionadas, que fueron alicuotadas y conservadas a -80°C hasta su uso. Una alícuota de cada dilución se descongeló para correr la curva estándar en cada ensayo de cuantificación, luego de lo cual fueron descartadas, evitando de esta manera la degradación del ADN por congelamiento/descongelamiento del material, minimizando así desviaciones en las determinaciones de carga parasitaria. La figura 5 resume el protocolo realizado para la construcción de la curva estándar.

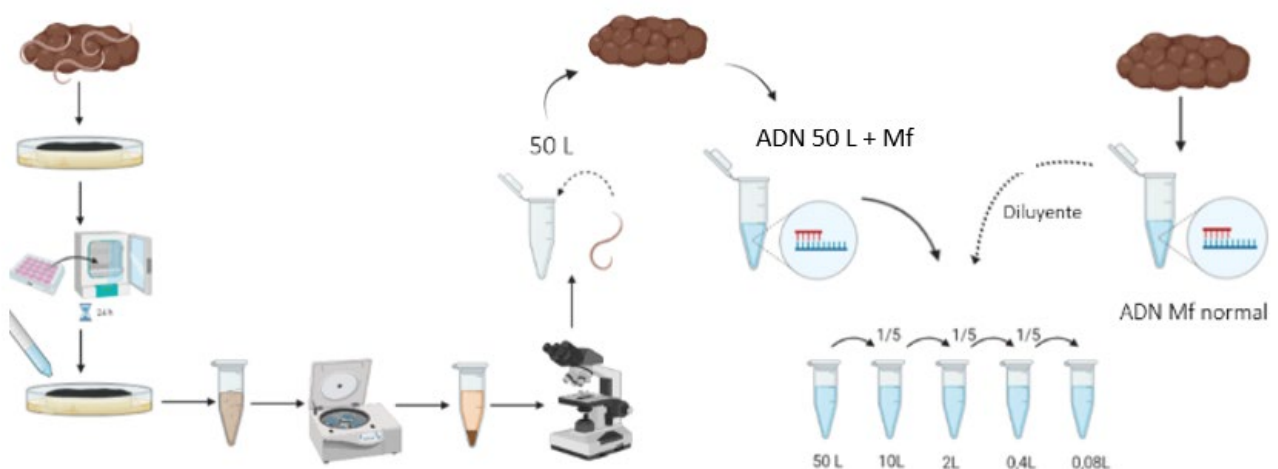


Figura 5: Protocolo para la construcción de la curva estándar para cuantificación.

Para cada ensayo de qPCR de la curva estándar (realizadas según se describe en el punto 4.6), se graficaron los valores de Ct promedio de cada punto frente al logaritmo en base 10 de la concentración de ADN, ajustando a una recta mediante una regresión lineal. A partir de la pendiente de la curva estándar se determinó la eficiencia de cada reacción de amplificación mediante la fórmula 1.

$$Eficiencia = 10(-1/pendiente) - 1 \quad (1)$$

El coeficiente de correlación R2 obtenido en la regresión lineal se utilizó para determinar la linealidad del ensayo de qPCR. Se consideraron válidas aquellas curvas con eficiencia entre 90 y 110% y R2 superior a 0,98. Estos parámetros fueron obtenidos mediante el Software del equipo de qPCR (StepOne Software v2.3).

4.6 PCR en tiempo real (qPCR)

Se amplificó un fragmento de 101 pb del gen codificante para subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S de *S. stercoralis* (Genbank Accession Number AF279916) utilizando los cebadores Stro_FW 18S-1530F 5'-GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3' y Stro_Rev 18S-1630R 5-TGCCTCCTGGATATTGCTCAGTTC-3' (Verweij et al, 2009).

Para esta PCR en tiempo real se preparó la master mix según las siguientes condiciones: cebadores 3 pmol, Hot FirePol DNA Polymerase 1X (Solis BioDyne), MgCl₂ 4 mM, BSA 4 µg/µl y ADN 2 µl en un volumen final de reacción de 20 µl. Como controles negativos se utilizaron agua (control sin ADN molde) y ADN de materia fecal de voluntarios sanos, y como controles positivos, ADN de larvas L3 de *S. stercoralis*. Se utilizó un control interno (ver punto 4.7 de esta sección) indicativo de la correcta extracción e integridad del ADN.

Como primer paso de la amplificación por PCR en tiempo real, se realizó una incubación a 95°C por 15 min que permite la apertura de la doble cadena del ADN molde, disociación de cebadores unidos inespecíficamente y de dímeros de cebadores formados a bajas temperaturas, seguida por: 40 ciclos de 95°C (15s), 60°C (30s) y 72°C (30s). Se realizó el *melting* durante 20s

a 95°C, 1 min a 60°C, seguido de incrementos de 0,3°C hasta alcanzar los 95°C. Se utilizó un equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). En cada ensayo de PCR en tiempo real, se incluyeron 3 réplicas de cada punto de la curva. Las cargas parasitarias de los pacientes se determinaron interpolando los valores promedio de Ct obtenidos para cada muestra, procesadas también por triplicado, en la curva estándar utilizando el software StepOne Software v2.3

4.7 Validación analítica del ensayo de qPCR

Se determinaron la sensibilidad y especificidad analíticas del método de qPCR para detección de *S. stercoralis*.

La sensibilidad analítica o límite de detección (LOD) de un ensayo es la menor concentración de ADN que la técnica detecta de forma confiable. Determinarlo permite asegurar que los resultados que se obtienen mediante una técnica de diagnóstico son certeros.

Para calcularlo se utilizaron datos extraídos de los experimentos de qPCR realizados con los puntos de la curva estándar para cuantificación de carga parasitaria, fijando como LOD la concentración mínima en la cual la secuencia blanco es amplificada al menos en el 95% de las determinaciones (Bustin *et al.*, 2009).

La especificidad de un método de diagnóstico se refiere a su capacidad para detectar exclusivamente el blanco de interés. La especificidad de la qPCR se evaluó usando como molde ADN extraído de parásitos coendémicos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*, de muestras de materia fecal de pacientes con diagnóstico positivo de infecciones por levaduras (habitualmente *Candida albicans*) o por otros parásitos intestinales como *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium sp.*, de ADN obtenido de cultivos de *E. coli* y de muestras de materia fecal de voluntarios sanos sin antecedentes de infecciones por parásitos intestinales ni otros patógenos intestinales.

4.8 Control interno de amplificación

El uso de controles internos en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos permite verificar que se ha extraído ADN de la muestra en estudio y su integridad, además de valorar una posible inhibición de la amplificación por contaminantes, frecuentemente presentes en materia fecal.

Como control interno de amplificación (IAC) se utilizó un plásmido pZErO-2 que contiene una secuencia de *Arabidopsis thaliana* (pZErO-2 IAC) (Duffy *et al.*, 2009), linealizado con la enzima de restricción *Pst*I . El plásmido fue gentilmente cedido por la Dra. Margarita Bisio (Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chaben). Para obtener el plásmido en cantidad suficiente a fin de realizar este trabajo, se siguieron los pasos que se describen a continuación.

4.8.1 Preparación de Bacterias Competentes

Se preparó un cultivo de 2 ml de bacterias *Escherichia coli* DH5 α en medio LB sin antibiótico, en condiciones de esterilidad, y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se tomaron 500 μ l del cultivo y se inocularon en 50 ml de medio LB sin antibiótico, dejándolo crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4-0,6. Se transfirió el cultivo a un tubo estéril y se incubó durante 20 min en hielo. Se centrifugó a 4500 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 25 ml de CaCl₂ 50 mM estéril y frío y se incubó en hielo por 10 min. Se repitió la centrifugación y el sedimento se resuspendió en 4,5 ml de CaCl₂ 50 mM y 0,5 ml de glicerol. Se congelaron en nitrógeno líquido alícuotas de 50 μ l de la preparación que luego se conservaron a -80°C.

4.8.2 Transformación de Bacterias Competentes

A las bacterias competentes *E. coli* DH5 α se les agregó 150 μ l de plásmido pZErO-2 IAC (177,7 ng/ μ l). Se incubó en hielo durante 30 min, luego durante 40 s en un baño a 42°C y

por último nuevamente en hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 500 µl de medio de cultivo LB sin antibiótico y se incubó en un baño a 37°C durante 20 min. Se centrifugó por 5 min a 5000 rpm, se descartó el volumen y se resuspendió el sedimento.

Finalmente, en condiciones de esterilidad bajo mechero, se plaqueó la suspensión de bacterias cultivadas en LB-agar suplementado con kanamicina. Esto se incubó a 37°C durante 16 hs de manera de obtener colonias aisladas que posean el plásmido de interés, las cuales se estriaron en nuevas placas de LB-Kanamicina.

Para verificar la presencia del plásmido en los clones aislados se realizó una *colony* PCR. El ADN molde se obtuvo resuspendiendo bacterias de cada clon en 50 µl de agua e incubando esa suspensión durante 10 min a 100°C. Luego se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm para separar los detritos celulares. Se utilizaron 3 µl del sobrenadante como templado para la PCR, en la cual se utilizaron los cebadores: IS Fw (5'-AACCGTCATGGAACAGCACGTAC-3') e IS Rv (5'-CTAGAACATTGGCTCCCGCAACA-3'). Se preparó la master mix según las siguientes concentraciones: Buffer TAS 1X, MgCl₂ 3,75 mM, cebadores 0.2 mM de cada uno, Polimerasa Taq T-Plus (Inbio Highway) 1.25 U, dNTPs 0.2 mM (volumen final de reacción 20 µl). Como control negativo se utilizó agua y como control positivo, el plásmido pZErO-2 IAC. El perfil de ciclado fue el siguiente: 95°C durante 10 min, 30 ciclos de 95°C durante 45 s, 60°C durante 45 s, 72°C durante 45 s y una elongación final de 72°C durante 10 min. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% para verificar la presencia de productos de amplificación a partir del plásmido de interés.

4.8.3 MiniPrep de ADN plasmídico

Para la purificación del ADN plasmídico se realizó una Minipreparación. Para ello se tomó una colonia aislada de una estría en placa con medio selectivo y se inocularon en 3 ml de medio LB-kanamicina. Esto se incubó durante toda la noche a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 9000 rpm por 5 min en tubos eppendorf autoclavados. Se resuspendió el sedimento de bacterias en 200 µl de solución P1 (50 mM Tris, pH 7,6-8; 10 mM EDTA, pH 8; 100 µg/ml RNAsa), se mezcló suavemente e incubó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de solución P2 (200 mM NaOH: 1% SDS) y se

repitió la incubación anterior. Luego, se agregaron 200 µl de solución P3 (3 mM de NaAC, pH 5,5) y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó 20 min a 12000 rpm y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo autoclavado, repitiendo la misma centrifugación, para eliminar todos los restos insolubles. Se agregó 1 vol de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó 10 min a máxima velocidad. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadieron 0,1 vol de la solución P3 y 0,6 vol de isopropanol. Se centrifugó 35 min a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento agregando 500 µl de etanol 70% frío. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se secó el sedimento en un baño seco a 60°C y finalmente se resuspendió en 20 µl de H₂O autoclavada.

4.8.4 Digestión del plásmido

Se realizó la digestión del plásmido obtenido en el paso anterior utilizando la enzima de restricción PstI (New England Biolabs) en presencia del buffer NEB 3 y BSA. Se incubó durante 2 hs a 37°C en baño termostático y finalmente se inactivó la enzima durante 20 min a 80°C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido digerido y sin digerir de manera de verificar la correcta digestión.

4.9 Análisis de Datos

Se construyó una base de datos de pacientes de manera de conglomerar los datos clínicos y epidemiológicos, así como los obtenidos en este trabajo.

El procesamiento estadístico de datos se realizó utilizando las siguientes herramientas informáticas: SSPS Statistics (IBM), Graph Pad Prism.

5. Resultados

5.1 Optimización de la qPCR

Para optimizar la qPCR para detección de *S. stercoralis* se probaron distintas condiciones de reacción. En primer lugar, se realizó la reacción con 2 master mix distintas: Hot FirePol DNA Polymerase (5X, Solis Biodyne) y Power-Up Sybr Green Master Mix (2X, ThermoFisher), con la finalidad de determinar con cuál de ellas se obtienen mejores resultados. Se utilizaron como molde diluciones sucesivas 1/5 de ADN proveniente de larvas de *S. stercoralis* que componen la curva descrita en el punto 4.5. Los resultados se analizaron utilizando el software StepOne Plus v2.3. Se obtuvieron los valores de eficiencia y coeficiente de correlación R^2 .

Para la qPCR con la Mix Hot FirePol DNA Polymerase (5X Solis Biodyne) se obtuvo una eficiencia de 81.994% y un R^2 de 0.996, y con la PowerUp Sybr Green Master Mix la eficiencia fue de 83.727% y R^2 de 0.989. Los resultados obtenidos con cada master mix se presentan en la Tabla I.

Tabla I: Valores de Ct obtenidos en la qPCR para cada punto y master mix utilizada. También se reflejan el promedio y la diferencia de Ct entre diluciones.

| Cantidad de larvas | Mix Hot FirePol DNA Polymerase | | | | PowerUp Sybr Green Master Mix | | | |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| | Ct ₁ | Ct ₂ | Promedio Ct | Δ Ct | Ct ₁ | Ct ₂ | Promedio Ct | Δ Ct |
| 10 | 24.72 | 24.85 | 24.785 | - | 26.47 | 25.99 | 26.23 | - |
| 2 | 27.47 | 27.28 | 27.375 | 2.590 | 28.13 | 28.42 | 28.275 | 2.045 |
| 0.4 | 29.90 | 30.05 | 29.975 | 2.600 | 31.45 | 31.81 | 31.630 | 3.355 |
| 0.08 | 33.17 | 32.50 | 32.880 | 2.905 | 33.77 | 34.29 | 34.030 | 2.400 |

Si bien los resultados fueron similares para ambas master mix, se decidió continuar la optimización de la reacción utilizando la mix Hot FirePol DNA Polymerase (5X, Solis Biodyne) ya que con ese reactivo se obtuvieron valores de Ct menores, lo cual indica que el producto se amplifica con menor cantidad de ciclos. A la vez, los valores de Δ Ct entre los sucesivos puntos de la curva fueron más regulares que con PowerUp Sybr Green Master Mix.

En segundo lugar, se variaron las concentraciones de MgCl₂, cebadores y BSA en la master mix de manera de determinar qué condiciones favorecen la reacción y aumentan la eficiencia. En la Tabla II se observan los valores de eficiencia y R² obtenidos para cada condición evaluada.

Tabla II: Valores de eficiencia y R² en relación a distintas condiciones de MgCl₂, cebadores y BSA en la mix de la qPCR

| | Mix 1 (original) | Mix 2 | Mix 3 | Mix 4 | Mix 5 |
|----------------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| MgCl ₂ | 4 mM final | 2.5 mM final | 5 mM final | 4 mM final | 4 mM final |
| Cebadores | 3 pmol | 3 pmol | 3 pmol | 1.5 pmol | 3 pmol |
| BSA | 0.2 ug/ul | 0.2 ug/ul | 0.2 ug/ul | 0.2 ug/ul | 0.1 ug/ul |
| Eficiencia | 82.842% | 66.892% | 89.268% | 59.688% | 90.232% |
| R² | 0.996 | 0.992 | 0.999 | 0.98 | 0.989 |

Observando los resultados obtenidos podemos determinar que las condiciones que incrementan la eficiencia de la reacción son la utilización de una mayor concentración de MgCl₂ (5 mM final), cebadores (3 pmol) y una menor concentración de BSA (0.1 ug/ul). Combinando estas condiciones se realizó una qPCR y se obtuvieron valores de eficiencia y R² 94.878% y 0.996, respectivamente. La figura 6 muestra un gráfico de amplificación representativo de los obtenidos en las sucesivas corridas de qPCR. Con flechas se indican las cantidades de larvas correspondientes a las réplicas técnicas de cada punto de la curva.

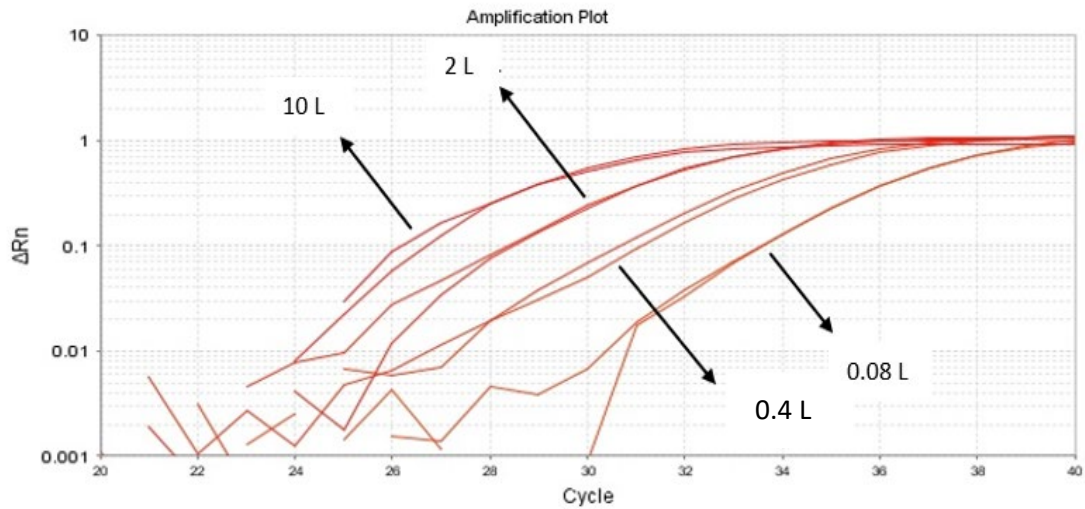


Figura 6: Curva de amplificación representativa de la qPCR para 10, 2, 0.4 y 0.08 larvas.

La curva de *melting* generada para todas las condiciones se observa en la Figura 7, siendo la temperatura de *melting* del producto de amplificación aproximadamente 84,39°C. Para las muestras que contienen ADN de *S. stercoralis*, se observa un pico mayoritario y un patrón irregular en el comienzo, el cual se repitió en las corridas sucesivas.

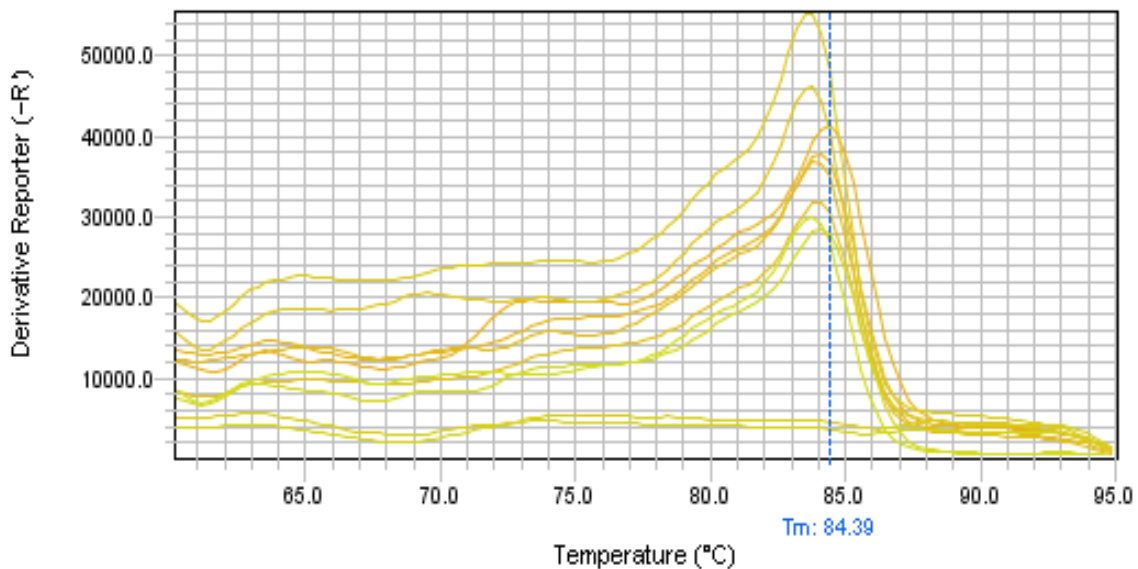


Figura 7: Curva de *melting* para el producto de amplificación de la qPCR de *S. stercoralis*

Para descartar la presencia de dímeros de cebadores y/o amplificación inespecífica como fuente de ese patrón, se corrieron los productos de amplificación en un gel de agarosa 2% para resolverlos por tamaño (Figura 8). En este no se observó la presencia de bandas correspondientes a dímeros de cebadores o productos de tamaño diferente al esperado, por lo cual se concluyó que la amplificación es específica y por lo tanto, que ésta es la forma característica de la curva de *melting* para este tipo de muestra.

En base a los resultados obtenidos, concluimos que, las mejores condiciones para la amplificación son el uso de la master mix Hot FirePol DNA Polymerase (5X, Solis Biodyne) con concentraciones finales de cebadores 150mM, MgCl₂ 5 mM y BSA 0.1 ug/ul.

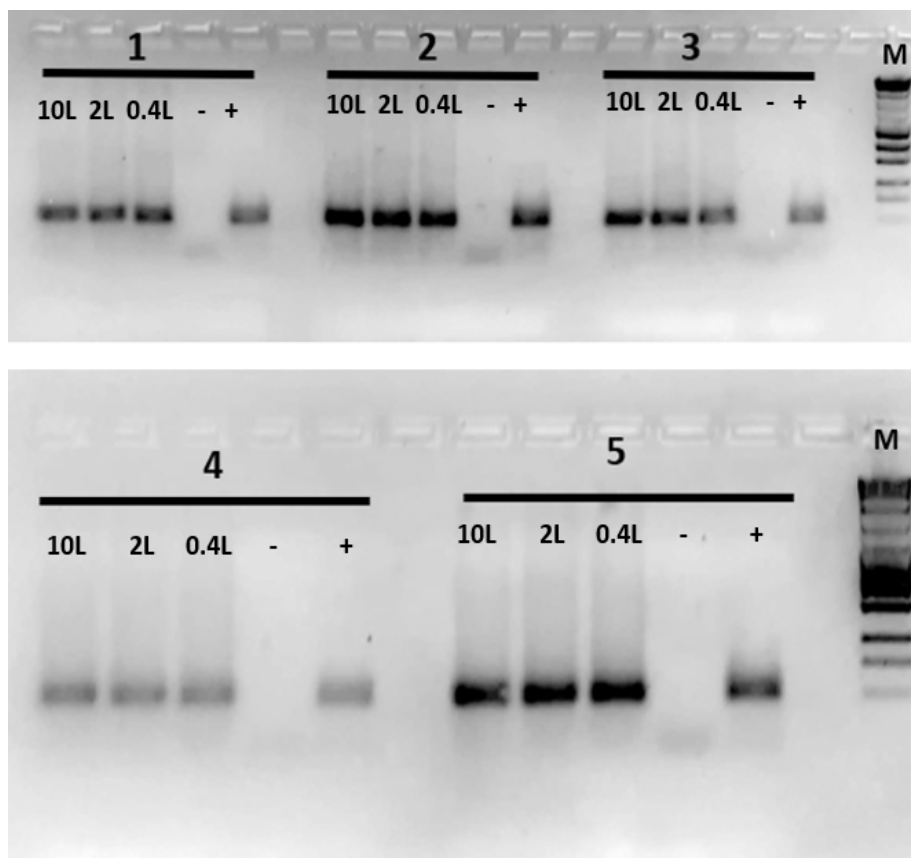


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa 2%. Los números 1-5 indican las distintas condiciones detalladas en la Tabla II. Para cada condición se sembró, en el siguiente orden, de izquierda a derecha: el producto obtenido de la qPCR con los puntos de la curva correspondientes a 10 larvas, 2 larvas, 0.4 larvas, NTC (control negativo sin molde), ADN de larvas (control positivo). Para ambos geles, en la última calle se sembró el marcador de peso molecular, MassRuler™ Express Forward DA Ladder Mix (ThermoFisher, Scientific, Inc.).

5.2 Curva estándar para determinación de carga parasitaria

Para determinar mediante la qPCR optimizada la carga parasitaria de *S. stercoralis* en muestras de materia fecal de pacientes, se preparó una curva de cinco puntos correspondientes a diluciones sucesivas al quinto de ADN de materia fecal de voluntarios sanos contaminada con una cantidad conocida de larvas del parásito y usando el ADN de materia fecal de voluntarios sanos como diluyente. El primer punto de la curva en los ensayos para cuantificación correspondió a 50 larvas/gr de materia fecal, y se realizaron 3 réplicas de cada punto de la curva.

En la Figura 9 se muestra una curva estándar representativa de todas las corridas realizadas junto a sus valores de eficiencia (89.861) y R^2 (0.982). En este caso, estos parámetros se encuentran algo por debajo de los ideales, probablemente debido a la influencia que comprobamos, ejerce la matriz de las muestras clínicas en estudio (ver sección 5.6).

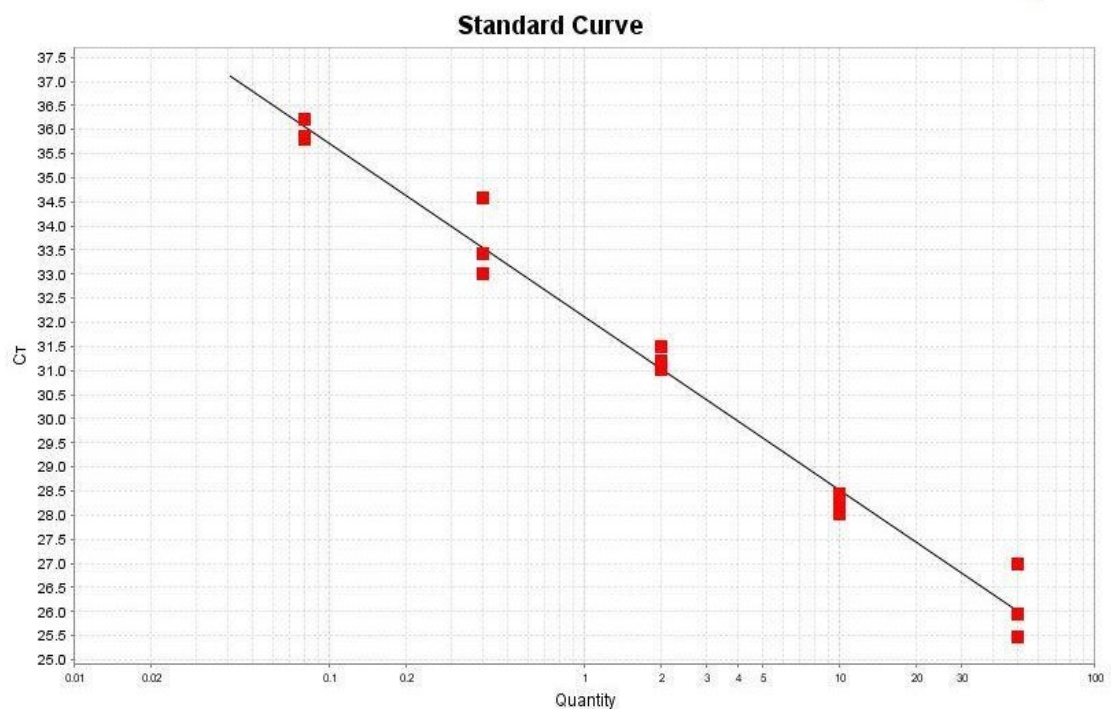


Figura 9: Curva estándar para determinación de *S. stercoralis* en muestras de materia fecal de pacientes infectados, representativa de diferentes corridas realizadas.

5.3 Determinación de la Sensibilidad Analítica

El límite de detección (LOD) o sensibilidad analítica de un método para diagnóstico se define como la concentración más baja en la cual se alcanzan resultados positivos para el 95 % de las determinaciones (Bustin *et al.*, 2009). Para conocer este parámetro para la qPCR para detección de *S. stercoralis*, conglomeramos los resultados de 20 experimentos independientes, realizados con las diluciones de ADN de la curva estándar para cuantificación de carga parasitaria (Tabla III).

La secuencia blanco fue detectada en el 100% de las reacciones en los puntos representativos de 50, 10, 2 y 0.4 larvas/gr de materia fecal (los resultados para las dos primeras cantidades no fueron incluidos en esta Tabla). Con 0.08 larvas/gr de materia fecal el resultado es positivo en el 95 % de las determinaciones, mientras que cuando la muestra contiene 0.0016 larvas/gr de materia fecal, se detectó ADN parasitario sólo en 33% de las reacciones. El límite de detección se estableció por lo tanto en 0.08 larvas/gr de materia fecal.

Tabla III: Determinación de límite de detección de qPCR para *S. stercoralis*. Resultados de 20 ensayos independientes con puntos de la curva estándar para cuantificación de carga parasitaria.

| Experimento | Puntos de la curva de calibración para determinar carga parasitaria en materia fecal | | | |
|-------------|--|------------------|-------------------|---------------------|
| | 2 larvas/gr mf | 0.4 larvas/gr mf | 0.08 larvas/gr mf | 0.0016 larvas/gr mf |
| 1 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 2 | Detectable | Detectable | Detectable | Detectable |
| 3 | Detectable | Detectable | Detectable | ND |
| 4 | Detectable | Detectable | Detectable | ND |
| 5 | Detectable | Detectable | Detectable | Detectable |
| 6 | Detectable | Detectable | Detectable | ND |
| 7 | Detectable | Detectable | Detectable | ND |
| 8 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 9 | Detectable | Detectable | Detectable | Detectable |
| 10 | Detectable | Detectable | Detectable | ND |
| 11 | Detectable | Detectable | Detectable | ND |
| 12 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 13 | Detectable | Detectable | ND | N/E |
| 14 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 15 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |

| | | | | |
|----|------------|------------|------------|-----|
| 16 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 17 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 18 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 19 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |
| 20 | Detectable | Detectable | Detectable | N/E |

ND=no detectable, N/E=no ensayado.

5.4 Especificidad de la Reacción

La especificidad de la qPCR para detectar el fragmento del gen *18S rDNA* de *S. stercoralis* fue evaluada utilizando ADN extraído a partir de cultivos de *E. coli*, de materia fecal con levaduras (*Candida albicans*) que pueden estar presentes en el tracto digestivo del huésped, de otros patógenos intestinales de interés por ser coendémicos (*Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*), de muestras de materia fecal humana en las que se detectaron otros enteroparásitos (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium sp.*), así como de materia fecal de voluntarios sanos. Se verificó la ausencia de productos de amplificación que podría deberse a la hibridación inespecífica de los cebadores en el ADN del humano y microorganismos que coexisten en la muestra evaluada.

Estos experimentos permiten concluir que la técnica en desarrollo es específica para ser utilizada con propósitos de diagnóstico.

5.5 Control Interno de Amplificación (IAC)

Se obtuvo el IAC por digestión con la enzima de restricción *PstI* de un plásmido pZErO-2 que contiene una secuencia de *A. thaliana* (Duffy *et al.*, 2009), obtenido por transformación de bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes y extracción de ADN plasmídico. Para verificar la transformación de las bacterias se realizó una *colony*-PCR seguida de una electroforesis en gel de agarosa en la que se confirmó la presencia del plásmido de interés (Figura 10A). Con uno de los clones que contienen el plásmido se realizaron minipreparaciones de ADN, para obtenerlo en cantidad suficiente y generar un stock del IAC. Se verificó la concentración y

calidad de las mismas en un equipo NanoDrop (ThermoFisher Scientific) (Tabla IV). Posteriormente, se realizó la digestión del plásmido con la enzima de restricción *PstI* y se realizó una electroforesis para comprobar la digestión (Figura 10B).

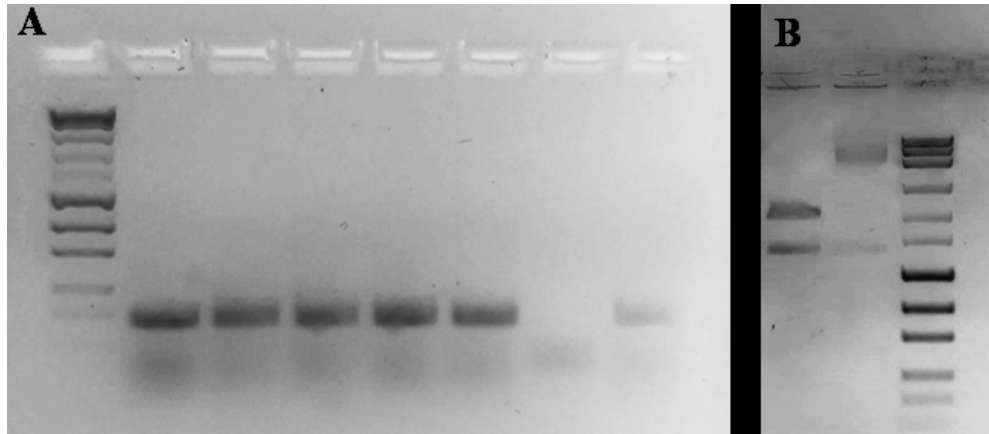


Figura 10: Obtención del plásmido del IAC. **A)** Electroforesis en gel de agarosa de la *colony*-PCR. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2-6: producto de amplificación de la secuencia de *A. thaliana* en 5 colonias aisladas. Calle 7: control negativo (H₂O). Calle 8: control positivo (plásmido IAC). **B)** Digestión del plásmido con *PstI*. Calle 1: Plásmido sin digerir. Calle 2: Plásmido digerido. Calle 3: Marcador de peso molecular MassRuler™ Express Forward DA Ladder Mix (ThermoFisher, Scientific, Inc.).

Tabla IV: Concentración y calidad del plásmido purificado.

| | Miniprep 1 | Miniprep 2 | Miniprep 3 | Miniprep 4 |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Concentración (ng/μl) | 1059.06 | 558.17 | 396.82 | 479.03 |
| 260/280 | 1.83 | 1.84 | 1.78 | 1.79 |
| 260/230 | 2.05 | 2.07 | 2.07 | 2.06 |

En este gel de agarosa se puede observar, para el plásmido sin digerir, la presencia de las formas *nickeada* y superenrollada (la primera corre como una banda de tamaño superior a la segunda; Figura 9B, calle 1). En la calle con el producto de digestión se observan la forma linealizada (en una banda de mayor tamaño, acorde al plásmido con inserto) y una fracción superenrollada no digerida (banda de menor tamaño) (Figura 9B, calle 2).

El producto de digestión se conservó en alícuotas de pequeño volumen a -20°C hasta el momento de su utilización.

5.6 Pruebas de amplificación del Control Interno

El control interno de amplificación (IAC) fue agregado a las muestras de materia fecal de pacientes, previo a la extracción de ADN.

Para estandarizar la amplificación de este control, se realizaron ensayos de qPCR (en las mismas condiciones que la reacción para detección del gen *18S rDNA* de *S. stercoralis*), con el propósito de:

- Conocer si los oligonucleótidos específicos para el IAC hibridan con su ADN blanco en el contexto de la matriz de las muestras clínicas en estudio (materia fecal de voluntarios sanos, en este caso).
- Evaluar la eficiencia de la amplificación de la secuencia del IAC en presencia de ADN de materia fecal, comparando los resultados respecto de la utilización como molde del plásmido diluido en agua. Estas pruebas permiten analizar interferencias por inhibidores de la polimerasa presentes en el ADN extraído de heces.
- Descartar la presencia de amplificación cruzada con los oligonucleótidos cebadores del IAC en muestras de ADN de *S. stercoralis* y, viceversa, con los oligonucleótidos cebadores del gen *18S rDNA* del parásito utilizando el IAC como molde.
- Analizar la posibilidad de amplificar las dos secuencias blanco (de *S. stercoralis* y *A. thaliana*) en una reacción multiplex con los respectivos pares de cebadores específicos, diferenciando ambos productos utilizando curvas de melting.

En la Figura 11 se observa la amplificación del control interno utilizando diferentes cantidades de plásmido molde diluido en agua (panel A) o en presencia de ADN de heces de pacientes sin infectar (panel B).

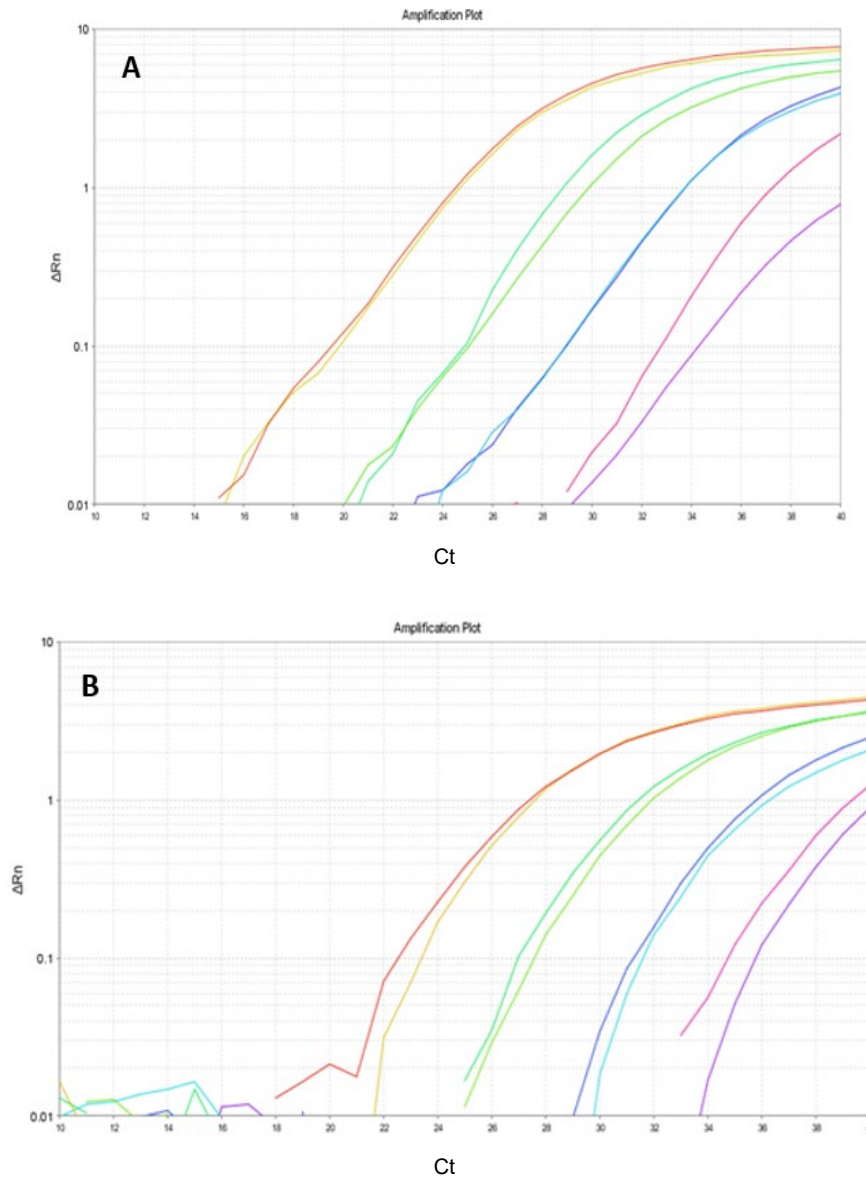


Figura 11: Gráficos representativos de las pruebas de amplificación del control interno con diferentes cantidades de plásmido molde. **A)** Curva de amplificación del IAC diluído en agua. **B)** IAC amplificado en presencia de materia fecal. Para ambos gráficos se representan de izquierda a derecha: 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng de plásmido.

Al analizar estos resultados se pudo observar que, a igual concentración de molde, cuando la muestra contiene ADN de materia fecal normal, el valor de Ct aumenta, es decir, que se necesitan ciclos de amplificación adicionales para alcanzar el umbral de fluorescencia, lo

cual se observa en el desplazamiento a la derecha de las curvas de amplificación al comparar ambos gráficos (Figura 10). La figura 12 resume la variación de Ct observada en presencia y ausencia de materia fecal. Esto denota una inhibición significativa que puede asociarse a la matriz de la muestra clínica, que fue corroborada analizando estadísticamente los datos (prueba t de muestras pareadas, $p=0,0188$).

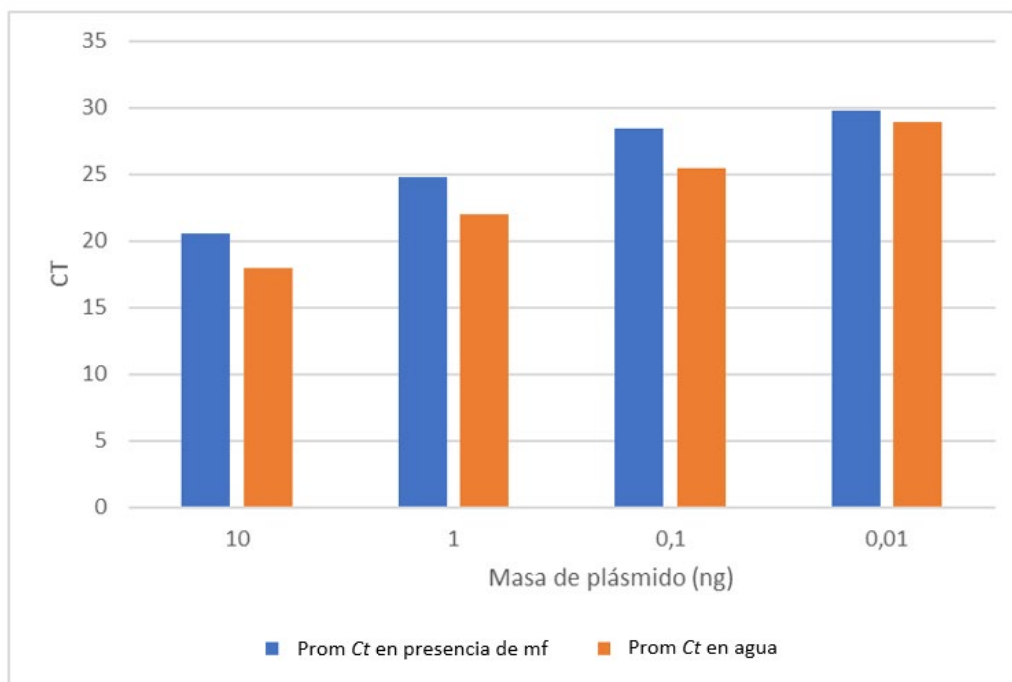


Figura 12: Variación de Ct en función de la presencia o ausencia de materia fecal. Se representan los puntos de 10, 1, 0,1 y 0,01 ng de plásmido. Prom= Promedio.

Las pruebas de especificidad permitieron determinar que la qPCR con los cebadores del IAC y de *S. stercoralis* hibridan específicamente en las secuencias blanco, independientemente de la presencia de ADN de materia fecal normal, y de ADN de larvas de *S. stercoralis*, descartando eventuales reacciones cruzadas que impedirían el uso de este plásmido como control interno en la técnica desarrollada. La Figura 13 muestra la corrida electroforética de los productos de amplificación de estas pruebas. En el panel izquierdo, comparando los productos corridos en las calles 1 a 3 y 5 a 7, se observa el efecto de inhibición que ejerce la matriz de la muestra (materia fecal), reduciendo la eficiencia de la amplificación.

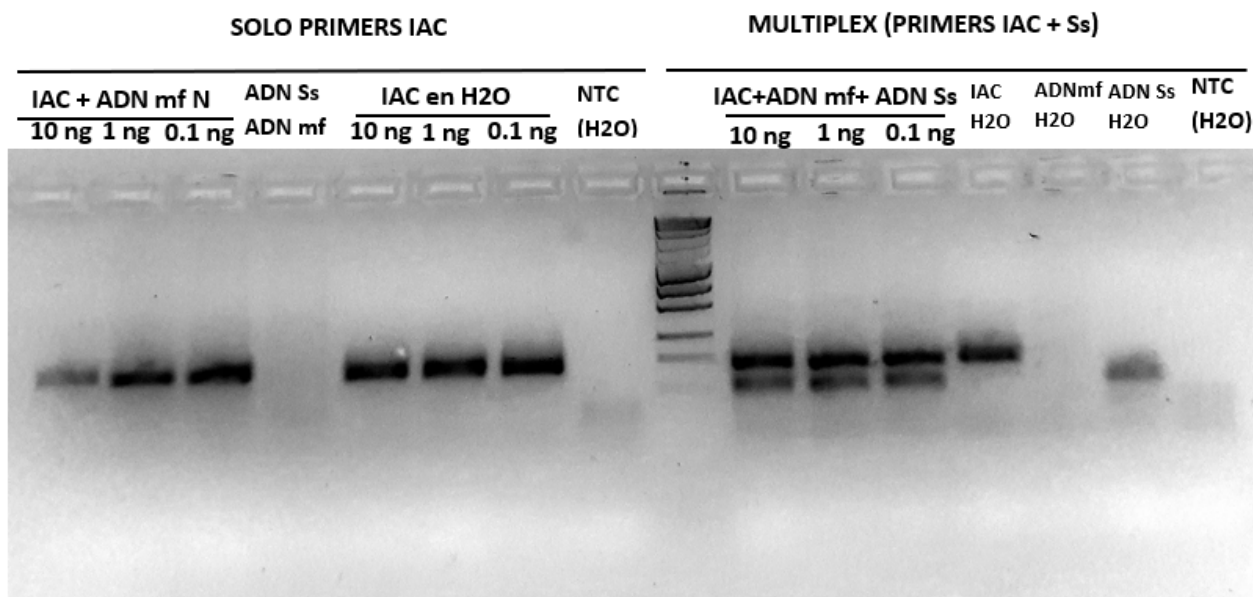


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de la prueba de especificidad del Control Interno de la qPCR. **Calles 1-8:** Prueba de especificidad de cebadores del IAC. **Calles 1-3:** diluciones sucesivas decrecientes 1/10 del IAC en presencia de DNA de mf de voluntarios sanos. **Calle 4:** DNA de *S. stercoralis* y DNA de materia fecal normal. **Calles 5-7:** diluciones sucesivas del IAC disuelto en agua. **Calle 8:** Control negativo sin templado (NTC). **Calle 9:** Marcador de peso molecular. **Calles 10-16:** Prueba de reacción multiplex. **Calles 10-12:** diluciones sucesivas 1/10 del IAC + DNA de *S. stercoralis* en presencia de DNA de mf normal. **Calle 13:** IAC diluido en agua. **Calle 14:** DNA mf normal diluido en agua. **Calle 15:** DNA *S. stercoralis* diluido en agua. **Calle 16:** Control negativo, sin templado (NTC).

En cuanto a las reacciones multiplex, en la curva de *melting* (Figura 14) se puede observar un único pico correspondiente a una T_m de 84.23°C. Pese a que no se observó el doble pico esperado para una reacción con dos amplicones, se pudo observar en la Figura 13 (calles 10, 11 y 12) dos bandas de amplificación coincidentes con los tamaños esperados: 101 pb para el fragmento del gen *18S rDNA* de *S. stercoralis* y 194 pb para el IAC. Por lo tanto, ambos productos se amplifican correctamente pero tienen una T_m muy similar, lo cual es una limitación para realizar la reacción multiplex, dado que no se pueden diferenciar.

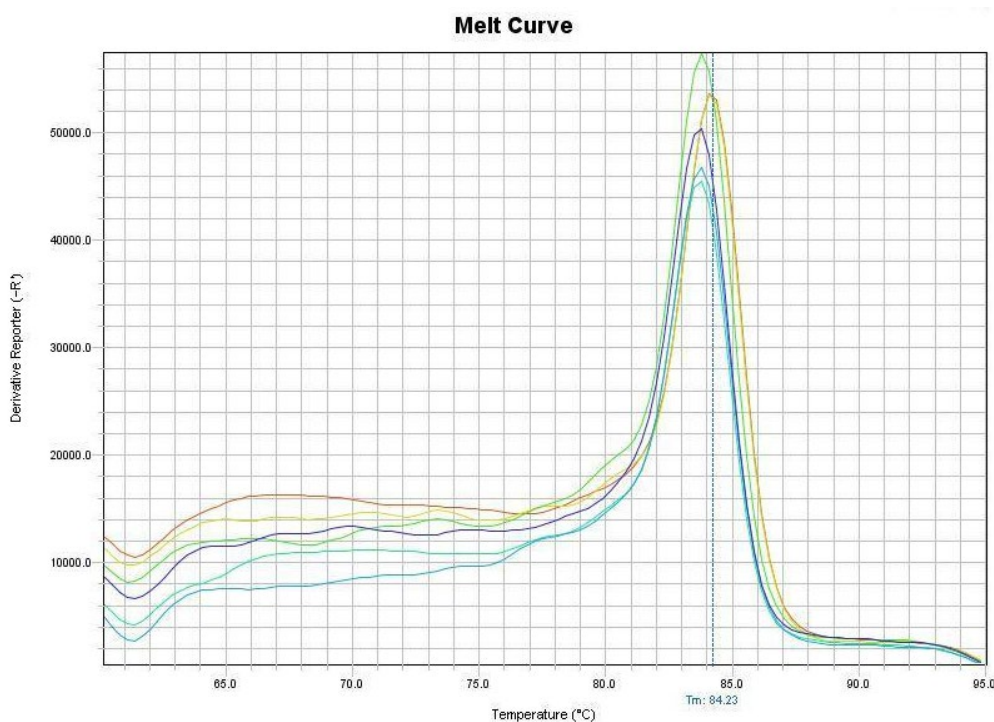


Figura 14: Curva de *melting* para la reacción multiplex. Se observa un único pico, demostrando la similitud de Tm para ambos productos.

Como consecuencia de las observaciones realizadas, en lo sucesivo se realizaron las qPCR en tubos independientes para las amplificaciones de las secuencias del gen *18S rDNA* de *S. stercoralis* y del IAC.

5.7 Control de calidad del ADN extraído de muestras de pacientes

Los pacientes involucrados en este estudio brindaron su consentimiento para participar del mismo, recibiendo de forma gratuita el tratamiento antiparasitario cuando fue detectada esta u otras infecciones por enteroparásitos. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas José de San Martín, dependiente de la Facultad de Medicina (UBA) (Anexo I).

Las muestras de materia fecal remitidas al laboratorio fueron analizadas en el momento de su recepción y conservadas a -20°C hasta el momento en el cual se realizó la extracción de ADN. Para este estudio se utilizó ADN recientemente extraído. No obstante, dado que las

muestras clínicas fueron conservadas por períodos variables de tiempo, para verificar la calidad del ADN extraído, se aplicaron dos estrategias. Por un lado, se determinaron la concentración y pureza del ADN total en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific). Por otra parte, las muestras fueron evaluadas con la PCR cualitativa diagnóstica para *S. stercoralis* para verificar la presencia e integridad del ADN parasitario. Cabe destacar que, para todos los pacientes incorporados al estudio, la PCR diagnóstica realizada en el momento de toma de cada una de estas muestras fue positiva en todos los casos. Los resultados se resumen en la Tabla V mientras que la Figura 15 muestra la corrida electroforética de los productos de amplificación.

Tabla V: Resultados de la concentración, relación 260/280 y 260/230 (medidos con NanoDrop) y de la PCR de punto final.

| Paciente | | Concentración (ng/ul) | 260/280 | 260/230 | PCR punto final |
|----------|----|-----------------------|---------|---------|-----------------|
| 1 | T0 | 25.97 | 1.78 | 0.82 | + |
| | T1 | 50.83 | 1.78 | 0.60 | + |
| | T2 | 37.49 | 1.77 | 0.63 | + |
| 2 | T0 | 34.30 | 1.77 | 0.98 | + |
| | T1 | 24.88 | 1.80 | 0.87 | + |
| | T2 | 23.86 | 1.86 | 0.81 | - |
| 3 | T0 | 14.19 | 1.96 | 0.84 | - |
| | T1 | 20.11 | 1.80 | 1.08 | - |
| | T2 | 42.56 | 1.90 | 0.63 | - |
| 4 | T0 | 25.98 | 1.74 | 0.99 | + |
| | T1 | 17.91 | 1.81 | 0.99 | + |
| | T2 | 34.36 | 1.74 | 0.97 | + |
| 5 | T0 | 30.42 | 1.67 | 0.87 | + |
| | T1 | 13.46 | 1.73 | 0.95 | + |
| | T2 | 43.69 | 1.74 | 0.98 | + |
| 6 | T0 | 20.45 | 1.77 | 0.80 | + |
| | T1 | 46.47 | 1.89 | 0.72 | - |
| | T2 | 38.24 | 1.74 | 0.94 | + |
| 7 | T0 | 31.05 | 1.74 | 0.96 | + |
| | T1 | 45.68 | 1.78 | 0.66 | + |
| | T2 | 60.91 | 1.78 | 0.62 | + |
| | T0 | 42.06 | 1.77 | 0.82 | + |

| | | | | | |
|----|----|-------|------|------|---|
| 8 | T1 | 42.71 | 1.76 | 0.83 | + |
| | T2 | 36.83 | 1.76 | 0.85 | + |
| 9 | T0 | 23.70 | 1.77 | 0.97 | + |
| | T1 | 24.19 | 1.76 | 0.80 | + |
| | T2 | 39.70 | 1.75 | 0.80 | + |
| 10 | T0 | 35.34 | 1.81 | 0.99 | + |
| | T1 | 28.72 | 1.78 | 0.96 | + |
| | T2 | - | - | - | - |
| 11 | T0 | 26.38 | 1.79 | 0.80 | + |
| | T1 | 33.53 | 1.78 | 0.96 | + |
| | T2 | - | - | - | - |

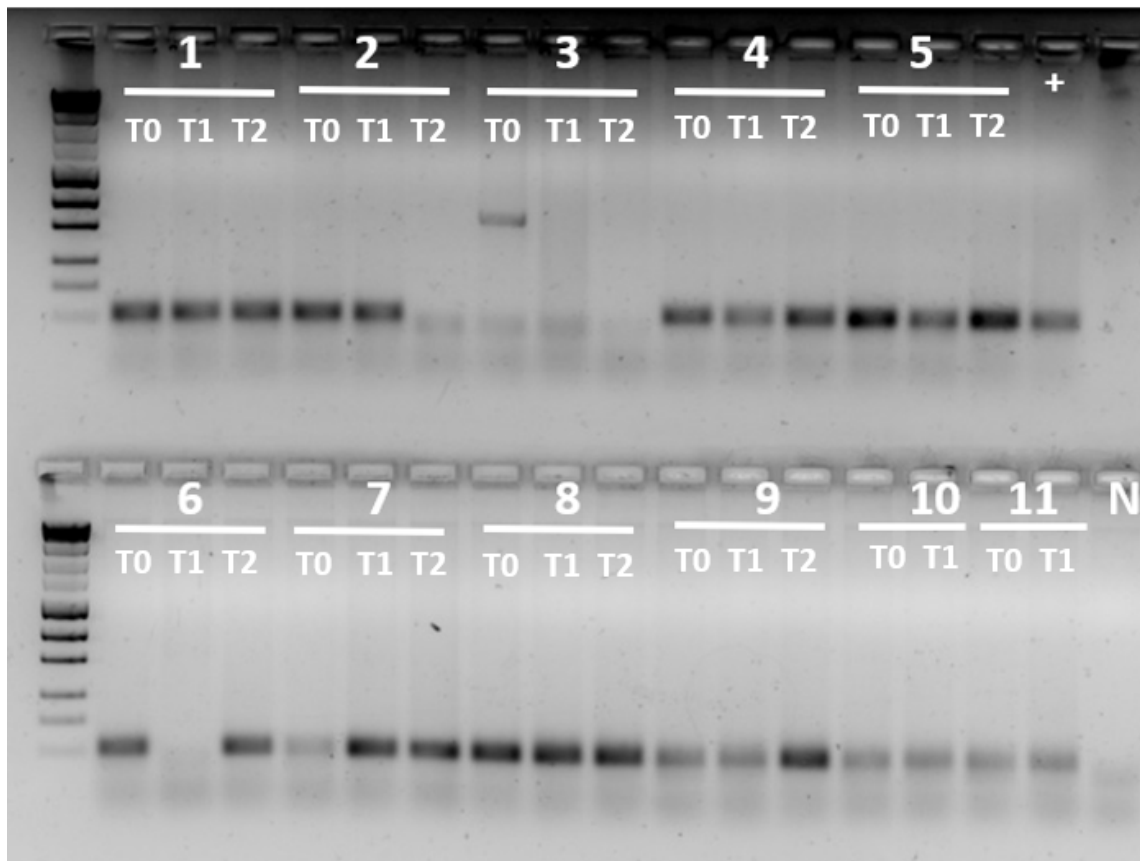


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa de las PCR de las muestras de pacientes. Se sembraron las muestras para los 3 tiempos de cada paciente: T0: momento del diagnóstico. T1: 3 meses post-tratamiento. T2: 1 año post-tratamiento. El orden de siembra sigue el orden de la tabla 6.

Las mediciones obtenidas por espectrofotometría corresponden a ADN total (de células

humanas, bacteriano, parasitario, etc.) y demuestran la presencia de ADN en todas las muestras, con niveles de pureza aceptables. No obstante, el resultado negativo de las PCR para *S. stercoralis* realizadas con ADN de los pacientes 2 (T3), 3 (T0, T1, T2) y 6 (T2), puede indicar una posible degradación del ADN parasitario de dichas muestras, probablemente debido al período de tiempo prolongado de conservación o presencia de inhibidores.

5.8 Determinación de *S. stercoralis* en muestras de pacientes

De manera de poder hacer un seguimiento en el tiempo y relacionar la carga parasitaria en materia fecal con la evolución clínica de los pacientes, se seleccionaron 3 muestras de cada individuo, correspondientes a 3 tiempos durante el periodo estudiado:

- T0: momento del diagnóstico
- T1: 3 meses post – tratamiento, aproximadamente
- T2: 1 año post – tratamiento, aproximadamente

Las muestras T1 o T2 fueron tomadas durante eventos de reactivación de la infección, ya sea clínica (denotada por aumento de eosinófilos en sangre) o parasitaria (detección de larvas en materia fecal), excepto para los pacientes 10 y 11, de quienes sólo se analizó una muestra post-tratamiento, por tratarse de pacientes que no reactivaron la infección. A estas muestras se les realizó la extracción de ADN y luego de controlar la calidad del mismo se corrió la qPCR, como se detalló anteriormente. Cada muestra se analizó por triplicado y en todos los ensayos se incluyó la curva estándar para cuantificación descripta previamente. Estos resultados se detallan para cada paciente en la Tabla VI.

En las pruebas de cuantificación de la carga parasitaria, las réplicas técnicas presentaban mucha dispersión (datos no mostrados), no permitiendo realizar una cuantificación confiable. Por este motivo, se decidió continuar el análisis tomando los resultados en forma cualitativa (positivo – negativo).

Los resultados de la qPCR y del diagnóstico convencional se detallan en la Tabla VI, junto a datos de la historia clínica de cada paciente (métodos de diagnóstico utilizados e

información sobre reactivación de la infección, si ocurrió).

Tabla VI: Resultados de la qPCR y del diagnóstico convencional de los pacientes y su evolución clínica. Se indica el momento y tipo de reactivación: RC (reactivación clínica) o RP (reactivación parasitaria). F: Fresco. CAN: Cultivo en Agar Nutritivo. S: Seriado.

| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
|----------|---------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 1 | Diagnóstico Convencional | F- CAN - | F- CAN - | F+ |
| | Reactivación | | no | RP |
| | qPCR | Positivo | Positivo | Positivo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 2 | Diagnóstico Convencional | F- CAN + | F- CAN - | F- CAN + |
| | Reactivación | | no | RP |
| | qPCR | Positivo | Negativo | Negativo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 3 | Diagnóstico Convencional | F – CAN + S+ | F- CAN – | F+ CAN - |
| | Reactivación | | RC | RP |
| | qPCR | Negativo | Negativo | Negativo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 4 | Diagnóstico Convencional | F+ CAN + | | F+ CAN - |
| | Reactivación | | no | RP |
| | qPCR | Positivo | Positivo | Positivo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 5 | Diagnóstico Convencional | F+ CAN + | F- CAN - | F+ CAN - |
| | Reactivación | | no | RP |
| | qPCR | Positivo | Negativo | Positivo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 6 | Diagnóstico Convencional | F- CAN – S - | F+ CAN - | F- CAN - |
| | Reactivación | | RP | no |
| | qPCR | Positivo | Negativo | Negativo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| | Diagnóstico | F- CAN – S - | F- CAN - | F- CAN - |

| | | | | |
|----------|---------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| 7 | Convencional | | | |
| | Reactivación | | RC | no |
| | qPCR | Positivo | Negativo | Negativo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 8 | Diagnóstico Convencional | F+ | F- CAN - | F- CAN - |
| | Reactivación | | RC | no |
| | qPCR | Positivo | Negativo | Negativo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 9 | Diagnóstico Convencional | F+ CAN + | F- CAN - | F- CAN - |
| | Reactivación | | RC | no |
| | qPCR | Positivo | Negativo | Negativo |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 10 | Diagnóstico Convencional | F- CAN + S- | F- CAN - | - |
| | Reactivación | - | no | - |
| | qPCR | Positivo | Negativo | - |
| Paciente | | T0 | T1 | T2 |
| 11 | Diagnóstico Convencional | F- CAN + | F- CAN - | - |
| | Reactivación | - | no | - |
| | qPCR | Positivo | Negativo | - |

Estos resultados muestran en general que para el momento T0 (diagnóstico) la qPCR es positiva (al igual que la PCR diagnóstica de punto final), así como también ante eventos de reactivación parasitaria, detectando correctamente el ADN ante la presencia de larvas del parásito en la materia fecal (pacientes 1-T2, 4-T2, 5-T2). Como excepción a esta observación general, en algunos casos el resultado fue negativo (muestra inicial del paciente 3 y del momento de reactivación de los pacientes 2, 3 y 6) hecho relacionado a la baja calidad del ADN de dichas muestras (sección 5.7). Por otro lado, para los pacientes con reactivación clínica se obtuvieron resultados negativos en la qPCR (pacientes 7-T1, 8-T1, 9-T1), lo cual permite inferir que la sensibilidad de esta técnica no es suficiente para detectar este tipo de reactivaciones, ya sea porque la carga parasitaria en materia fecal se encuentra por debajo del límite de detección

o porque las larvas no están presentes en el intestino (y por lo tanto no son eliminadas junto a las heces), sino en otros tejidos por los cuales migran en su ciclo de vida (por ejemplo, los pulmones), desde donde activan la respuesta mediada por eosinófilos, cuyo nivel en sangre aumenta.

Finalmente, los pacientes sin reactivación presentaron resultados positivos en T0 y negativos en T1 en ambos pacientes.

Del análisis comparativo de los métodos parasitológicos convencionales (fresco, seriado y/o CAN) con la qPCR surge que ésta, al igual que la PCR de punto final diagnóstica, detecta como positivas a muestras de pacientes cuyo examen parasitológico es negativo (pacientes 1-T0, 1-T1, 7-T0). Las causas de estas discordancias son múltiples y abarcan, entre otros, la intermitencia de la excreción de larvas, bajo número de parásitos eliminados, y la posibilidad de eliminación de larvas muertas en las heces, que al carecer de motilidad pueden ser detectadas por microscopía o métodos moleculares, no así en cultivos. Estas características refuerzan el concepto de la utilidad de los métodos moleculares para complementar el diagnóstico de la infección.

6. Discusión

Los métodos convencionales utilizados de rutina para diagnosticar la infección por *S. stercoralis* en materia fecal tienen una sensibilidad insuficiente debido a la escasa e intermitente excreción de larvas, aun cuando se aplican métodos de concentración (Ericsson *et al.*, 2001). También la especificidad de esas determinaciones es limitada, dada la similitud morfológica con larvas de uncinarias. Las técnicas serológicas no resuelven estos obstáculos dado que se han evidenciado su escasa especificidad y, particularmente en infecciones agudas, baja sensibilidad (Sudarshi *et al.*, 2003). La introducción de técnicas de biología molecular al diagnóstico de ésta y otras enfermedades parasitarias ha demostrado mejorar en gran medida estos parámetros (Verweij *et al.*, 2009, Repetto *et al.*, 2013, 2016).

En este trabajo se propuso la optimización de una qPCR para determinación de carga parasitaria en pacientes con estrongiloidiasis en el periodo postratamiento, como estrategia para seguimiento y detección de la reactivación parasitaria. Una herramienta con esta capacidad permitiría instaurar el tratamiento farmacológico y evitar las formas severas de la infección.

Las condiciones para realizar esta qPCR fueron definidas tomando como base un método publicado por otros autores (Verweij *et al.*, 2009) y adaptado en nuestro laboratorio para el diagnóstico molecular de la infección por *S. stercoralis* (Repetto *et al.*, 2013, 2016).

Si bien se utilizó un método de extracción de ADN adaptado para lograr una eficiente lisis de las larvas, en la etapa de optimización de la qPCR se encontraron dificultades que no permiten asegurar una cuantificación certera. En primer lugar, la eficiencia de la curva estándar no alcanzó el rango óptimo, hecho que atribuimos a la influencia de los inhibidores de la amplificación presentes en la materia fecal. Además, las réplicas técnicas presentaban alta dispersión. Estos factores limitan la posibilidad de aplicar este método para obtener resultados cuantitativos, por lo que se decidió seguir adelante expresando los mismos en forma cualitativa (detectable/no detectable). Este formato es habitual en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y brinda una herramienta precisa, rápida y de alto rendimiento para la detección de patógenos (Kralik y Ricchi, 2017).

Si bien las condiciones obtenidas no nos permitieron verificar la hipótesis planteada en esta tesis, se dio continuidad al análisis cualitativo de los resultados obtenidos con muestras de

pacientes incluidos en este estudio de seguimiento postratamiento.

Los ensayos realizados demostraron que la técnica detecta solo reactivaciones parasitarias (visualización de larvas en materia fecal). La qPCR no permitió adelantarse en el diagnóstico de las reactivaciones clínicas donde sólo la eosinofilia orienta a pensar en reactivación de estrongiloidiasis y la respuesta al tratamiento empírico con ivermectina confirma el diagnóstico de esta situación (Repetto *et al.*, 2018).

No obstante, la eosinofilia puede deberse a otras infecciones, no sólo por *S. stercoralis*. En aquellos casos en los cuales al retomar el tratamiento con ivermectina la eosinofilia persista, un seguimiento del paciente mediante la técnica de qPCR desarrollada en este trabajo, permitiría detectar la reactivación parasitaria y así no administrar en forma innecesaria la droga. Esta discriminación no es posible mediante la PCR diagnóstica de punto final, que permanece positiva en el periodo postratamiento (Repetto *et al.*, 2018).

En general, la sensibilidad diferencial de los métodos de diagnóstico (microscópicos, cultivo, moleculares) demuestra la importancia de combinar diferentes técnicas para lograr un diagnóstico preciso de la infección. En este sentido, esta qPCR podría representar una herramienta primordial para detectar tempranamente reactivaciones parasitarias de la infección y podría ser particularmente valiosa para el seguimiento de pacientes inmunocomprometidos, en quienes pueden desarrollarse formas severas de la estrongiloidiasis, potencialmente fatales (Bisoffi *et al.*, 2013). En la actualidad, el uso frecuente de drogas inmunosupresoras (corticoides, agentes bloqueantes de la respuesta por citoquinas) para tratar COVID-19, enfermedad muy frecuente debido a la pandemia, amplió el número de individuos con alto riesgo de reactivar la infección por *S. stercoralis* (Abdoli *et al.*, 2021), quienes deben ser periódicamente monitoreados para evitar que cursen formas graves de la enfermedad, no sólo en zonas endémicas sino también fuera de ellas, dada la eficacia parcial del tratamiento con ivermectina (Repetto *et al.*, 2018).

Recientemente nuestro grupo de trabajo llevó a cabo un análisis de la variabilidad genética de *S. stercoralis* en un grupo de 41 pacientes basada en la diversidad de una región de 404 pb del gen mitocondrial codificante para la Citocromo C oxidasa, subunidad 1 (*cox1*) (Repetto *et al.*, 2021). Se obtuvieron 10 haplotipos, siendo los más frecuentes las variantes HP24 y HP93, también presentes en el continente asiático. A partir del análisis de redes de

haplotipos pudieron definirse dos grupos o clusters divergentes con HP24 (cluster 1, C1) o HP93 (cluster 2, C2) como haplotipos fundadores. Además, 29 pacientes con *S. stercoralis* genotificados al momento del diagnóstico fueron seguidos en el tiempo evaluando episodios de reactivación mediante la observación de la aparición de larvas en los ensayos parasitológicos (fresco, CAN, seriado) o de síntomas clínicos (eosinofilia). A partir de este trabajo nuestro grupo pudo establecer que C1 es una variable de reactivación, independientemente del status inmunológico del paciente, y no se observaron diferencias significativas entre dicho status, la presentación clínica de la enfermedad y la clasificación en haplotipo/cluster (Repetto *et al.*, 2021). De esta manera, la determinación de haplotipos/clusters basados en la variabilidad del marcador *cox1.404* al momento del diagnóstico podría asistir al manejo del seguimiento de pacientes.

La identificación de C1 durante el diagnóstico sugiere la necesidad de un aumento en la frecuencia de la evaluación de pacientes con respecto a otras variantes. En este sentido, la utilización de la qPCR estandarizada en el presente trabajo constituye una nueva herramienta para llevar a cabo la detección de reactivaciones parasitarias, eventos que hasta el momento solo son determinados por CAN.

En este contexto se define el siguiente algoritmo de seguimiento de pacientes:

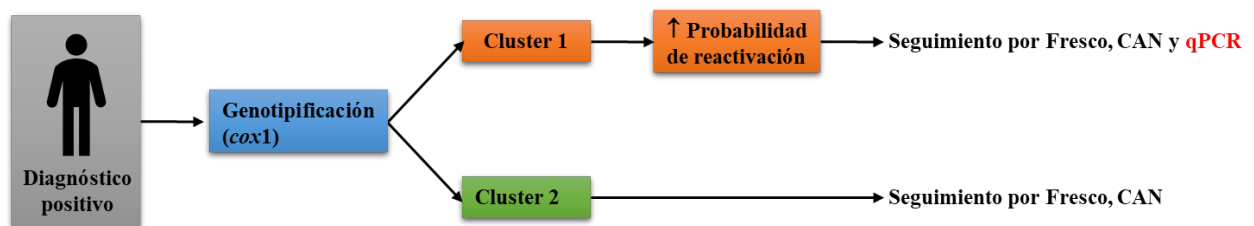


Figura 16: Algoritmo planteado para el seguimiento de pacientes en función del haplotipo infectante y posibilidad de reactivación.

Este algoritmo será entonces validado en el futuro a través de la inclusión de más pacientes al protocolo de seguimiento.

Para potenciar el uso de esta técnica, los pasos a seguir en el futuro incluyen introducir modificaciones técnicas que permitan abordar las limitaciones encontradas en este trabajo. Una

posibilidad es cambiar el uso de SYBR Green por sondas específicas marcadas con fluoróforos. Variar el sistema de detección puede mejorar el rendimiento del método dado que podría aumentar su sensibilidad y obtener determinaciones cuantitativas. Lograr estas metas e incrementar el número de pacientes evaluados por la qPCR permitiría avanzar con los objetivos iniciales propuestos en esta tesis y concluir acerca de la posibilidad de predecir reactivaciones de la infección tomando las fluctuaciones de la carga parasitaria como indicador.

7. Conclusiones

- Se optimizó una técnica de qPCR para materia fecal, la cual permite detectar la reactivación en la infección por *S. stercoralis*, sumando así una estrategia para la toma de decisiones durante el seguimiento de los pacientes en el periodo postratamiento.
- Se definieron el límite de detección del método y su especificidad, utilizando una amplia gama de ADNs controles y muestras de pacientes.
- Se optimizó un control interno de amplificación, indispensable para verificar en cada ensayo eventos de inhibición de la reacción y la correcta extracción de ADN del método de diagnóstico. Adicionalmente, este control permitió evaluar la influencia de la matriz de las muestras clínicas (materia fecal) en los valores obtenidos.
- Se realizaron pruebas con muestras de pacientes tomadas en el momento del diagnóstico inicial y a lo largo del periodo postratamiento para poner a prueba el método. Estas pruebas mostraron su utilidad para detectar reactivaciones de la infección con presencia de larvas en la materia fecal, no así reactivaciones clínicas.
- Resultará de utilidad modificar el formato del método desarrollado para ampliar su eficacia diagnóstica.

8. Bibliografía

- Abdoli, A., Falahi, S., & Kenarkoohi, A. (2021). COVID-19-associated opportunistic infections: a snapshot on the current reports. *Clinical and experimental medicine*, 1-20.
- Assefa, S., Erko, B., Medhin, G., Assefa, Z., & Shimelis, T. (2009). Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count. *BMC infectious diseases*, 9(1), 1-6.
- Beknazarova, M., Whiley, H., & Ross, K. (2016). Strongyloidiasis: a disease of socioeconomic disadvantage. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(5), 517.
- Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Krolewiecki, A. J., Mena, M. A., Chiodini, P. L., Anselmi, M., Juan Moreira & Albonico, M. (2013). *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(5), e2214.
- Bonne-Année S., Hess JA., Abraham D. 2011. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. *Immunol Res.* 51: 205-14.
- Buonfrate, D., Requena-Mendez, A., Angheben, A., Cinquini, M., Cruciani, M., Fittipaldo, A., Giorli, G., Gobbi, F., Piubelli, C. y Bisoffi, Z. (2018). Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), e0006229.
- Buonfrate, D., Requena-Mendez, A., Angheben, A., Muñoz, J., Gobbi, F., Van Den Ende, J., & Bisoffi, Z. (2013). Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-10.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
- Carrada-Bravo, T. (2008). *Strongyloides stercoralis*: vital cycle, clinical manifestations, epidemiology, pathology and treatment. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 55(2), 88-110.
- Duffy, T., Bisio, M., Altchek, J., Burgos, J. M., Diez, M., Levin, M. J., ... & Schijman, A. G. (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(4), e419.
- Ericsson, C. D., Steffen, R., Siddiqui, A. A., & Berk, S. L. (2001). Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 1040-1047.
- Farreras Valentí, P., & Rozman, C. (1988). *Medicina interna*. Capítulo 16, parte V: *Enfermedades producidas por vermes: helmintiasis*. Ediciones Doyma.

- Gorgani-Firouzjaee, T., Kalantari, N., Javanian, M., & Ghaffari, S. (2018). *Strongyloides stercoralis*: detection of parasite-derived DNA in serum samples obtained from immunosuppressed patients. *Parasitology Research*, 117(9), 2927-2932.
- Greaves, D., Cogle, S., Pollard, C., Aliyu, S. H., & Moore, E. M. (2013). *Strongyloides stercoralis* infection. *Bmj*, 347, f4610.
- Grove, D. I. (1996). Human strongyloidiasis. *Advances in parasitology*, 38, 251-309.
- Hall, A., Conway, D. J., Anwar, K. S., & Rahman, M. L. (1994). *Strongyloides stercoralis* in an urban slum community in Bangladesh: factors independently associated with infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5), 527-530.
- Izquierdo, I., Briones, J., Lluch, R., Arqueros, C., & Martino, R. (2013). Fatal *strongyloides* hyperinfection complicating a gram-negative sepsis after allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature. *Case Reports in Hematology*, 2013.
- Javanian, M., Gorgani-Firouzjaee, T., & Kalantrai, N. (2019). Comparison of ELISA and PCR of the 18S rRNA gene for detection of human strongyloidiasis using serum
- Keiser, P. B., & Nutman, T. B. (2004). *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 208-217.
- Knopp, S., Mgeni, A. F., Khamis, I. S., Steinmann, P., Stothard, J. R., Rollinson, D., ... & Utzinger, J. (2008). Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(11), e331.
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108.
- Lam, C. S., Tong, M. K. H., Chan, K. M., & Siu, Y. P. (2006). Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(1), 14-18.
- Marcos, L. A., Terashima, A., Canales, M., & Gotuzzo, E. (2011). Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. *Current infectious disease reports*, 13(1), 35-46.
- Maruyama, H., Yabu, Y., Yoshida, A., Nawa, Y., & Ohta, N. (2000). A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *The Journal of Immunology*, 164(7), 3749-3754.
- Mejia, R., & Nutman, T. B. (2012). Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Current*

Opinion in Infectious Diseases, 25(4), 458.

Milder, J. E., Walzer, P. D., Kilgore, G., Rutherford, I., & Klein, M. (1981). Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. *Gastroenterology*, 80(6), 1481-1488.

Montes, M., Sawhney, C., & Barros, N. (2010). *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(5), 50.

Mulcahy, G., O'Neill, S., Donnelly, S., & Dalton, J. P. (2004). Helminths at mucosal barriers—interaction with the immune system. *Advanced drug delivery reviews*, 56(6), 853-868.

Musto, A., Javier, I., Bosisio, N., Do Nascimento, M., Orellana, M., Rota, R., ... & Stephan, B. Manual de microbiología y parasitología. Primera Edición (2013). *Universidad Arturo Jauretche. Instituto de Ciencias de la Salud*.

Nabha, L., Krishnan, S., Ramanathan, R., Mejia, R., Roby, G., Sheikh, V., ... & Sereti, I. (2012). Prevalence of *Strongyloides stercoralis* in an urban US AIDS cohort. *Pathogens and global health*, 106(4), 238-244.

Navone, G. T., Zonta, M. L., Cociancic, P., Garraza, M., Gamboa, M. I., Giambelluca, L. A., ... & Oyhenart, E. E. (2017). Cross-sectional study of intestinal parasitosis in child populations in Argentina/Estudio transversal de las parasitosis intestinales en poblaciones infantiles de Argentina. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 41(3).

Neva, F. A. (1986). Biology and immunology of human strongyloidiasis. *Journal of Infectious Diseases*, 153(3), 397-406.

Núñez, P., Carmona, M., Urarte, E., López, C., Guzmán, P., Mercado, R., & Peña, S. (2019). Estrongiloidiasis gastrointestinal en paciente inmunocompetente: A propósito de un caso. *Gastroenterol. Latinoam*, 30(1), 107-112.

Nutman, T. B. (2017). Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related Strongyloides species. *Parasitology*, 144(3), 263.

Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., ... & Magnussen, P. (2009). Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(10), 967-972.

Paula, F. M., & Costa-Cruz, J. M. (2011). Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*, 138(11), 1331.

Repetto, S. A., Braghini, J. Q., Risso, M. G., Argüello, L. B., Batalla, E. I., Stecher, D.

- R., ... & Ruybal, P. (2021). Molecular typing of *Strongyloides stercoralis* in Latin America, the clinical connection. *Parasitology*, 1-11.
- Repetto, S. A., Durán, P. A., Lasala, M. B., & González-Cappa, S. M. (2010). High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(6), 1088-1093.
- Repetto, S. A., Ruybal, P., Batalla, E., López, C., Fridman, V., Sierra, M., ... & Alba Soto, C. D. (2018). Strongyloidiasis outside endemic areas: long-term parasitological and clinical follow-up after ivermectin treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 66(10), 1558-1565.
- Repetto, S. A., Ruybal, P., Solana, M. E., López, C., Berini, C. A., Soto, C. D. A., & Cappa, S. M. G. (2016). Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: a proposed algorithm. *Acta tropica*, 157, 169-177.
- Repetto, S. A., Soto, C. A., Cazorla, S. I., Tayeldin, M. L., Cuello, S., Lasala, M. B., ... & Cappa, S. G. (2013). An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Tropica*, 126(2), 110-114.
- Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E., & Muñoz, J. (2013). The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(1), e2002.
- Restrepo Von Schiller, I. C., Mazo Berrío, L. P., Salazar Giraldo, M. L., Montoya Palacio, M. N., & Botero Garcés, J. H. (2013). Evaluación de tres técnicas coproparasitológicas para el diagnóstico de geohelminthos intestinales. sample. *Infectious Diseases*, 51(5), 360-367.
- Sanpool, O., Intapan, P. M., Rodpai, R., Laoraksawong, P., Sadaow, L., Tourtip, S., ... & Thanchomnang, T. (2020). Dogs are reservoir hosts for possible transmission of human strongyloidiasis in Thailand: molecular identification and genetic diversity of causative parasite species. *Journal of Helminthology*, 94.
- Schär, F., Odermatt, P., Khieu, V., Panning, M., Duong, S., Muth, S., ... & Kramme, S. (2013). Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. *Acta Tropica*, 126(2), 89-92.
- Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., ... & Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), e2288.
- Siegel, M. O., & Simon, G. L. (2012). Is human immunodeficiency virus infection a

risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination.

Socias, M. E., Fernández, A., Gil, J. F., & Krolewiecki, A. J. (2014). Geohelminthiasis en la Argentina. Una revisión sistemática.

Spotin, A., Mahami-Oskouei, M., & Nami, S. (2019). Assessment of the global paradigms of genetic variability in *Strongyloides stercoralis* infrapopulations determined by mitochondrial DNA sequences. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 67, 101354.

Sudarshi, S., Stümpfle, R., Armstrong, M., Ellman, T., Parton, S., Krishnan, P., ... & Whitty, C. J. (2003). Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travellers compared with immigrants in a non-endemic country. *Tropical Medicine & International Health*, 8(8), 728-732.

Tehrani, M. F., Sharifdini, M., Zahabiun, F., Latifi, R., & Kia, E. B. (2019). Molecular characterization of human isolates of *Strongyloides stercoralis* and Rhabditis spp. based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1). *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-7.

Toledo, R., Munoz-Antoli, C., & Esteban, J. G. (2015). Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. In *Advances in Parasitology* (Vol. 88, pp. 165-241). Academic Press.

Vadlamudi, R. S., Chi, D. S., & Krishnaswamy, G. (2006). Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clinical and Molecular Allergy*, 4(1), 8.

Verweij, J. J., Canales, M., Polman, K., Ziem, J., Brienen, E. A., Polderman, A. M., & van Lieshout, L. (2009). Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4), 342-346.

Viney, M. E., Brown, M., Omoding, N. E., Bailey, J. W., Gardner, M. P., Roberts, E., ... & Whitworth, J. A. (2004). Why does HIV infection not lead to disseminated strongyloidiasis?. *The Journal of infectious diseases*, 190(12), 2175-2180.

World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017

9. Anexos

Anexo I: Aprobación del Comité de Ética del Hospital José de San Martín.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
COMITE DE ETICA DEL HOSPITAL DE CLINICAS
Av. Córdoba N° 2351 - Piso 11 - Ciudad de Buenos Aires - ARGENTINA



Juan Carlos Teoldi
Director
Médico, Biología

Ms. Luiss Pfeiffer
Coordinadora Académica
Filosofía, Biología

Silvina Casabé
Secretaria Administrativa

Adriana Abud
Trabajadora Social

Miguel Chaves Zumbano
Médico, Terapia Intensiva

Juan José Echeverriboada
Médico, Fertilidad

Gloria Genoni
Psicólogo Clínico

Daniel Goldemberg
Médico, Farmacología Clínica

Marcelo Gorga
Médico, Neuropsiquiatría

Norma Muras
Enfermera, Cuidados Paliativos

Valeria Picoalo
Abogada, Derechos Humanos

Mario Romero
Enfermero, Terapia Intensiva

Alfredo Raúl Semberoiz
Médico, Clínica Médica

Auxiliares

Ms. del Carmen Baqué
Médico, Transplante Renal

Alfredo Ortiz Frígola
Médico, Psiquiatría

Graciela Penco
Socióloga, Salud y Sociedad

Buenos Aires, 18 de septiembre de 2013.-

A: Investigadora Principal, Stella Maris González Cappa del Instituto de Investigaciones en Microbiología de la Facultad de Medicina

REF: Protocolo titulado "Estrongiloidosis en Argentina: diversidad poblacional de aislamientos de pacientes sin riesgo de reinfección exógena y seguimiento postratamiento"

DOCUMENTACION PRESENTADA: Proyecto de Investigación, Ficha epidemiológica-clínica de registro de datos, Consentimiento Informado para realizar Estudio Coproparasitológico y Perfil Inmunológico, Hoja de Información para el Paciente para realizar Estudio de Eosinofilia Periférica y Perfil Inmunológico, Hoja de Información para el Paciente para realizar Estudio Coproparasitológico, Formación del Biobanco

VISTA la documentación detallada anteriormente, relacionada con el estudio de referencia, la cual fue evaluada por la Comisión de Investigación de este comité en su reunión del día 17 del corriente mes,

ESTE COMITÉ DECIDE aprobar la documentación presentada para su implementación en el Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires, sujeto al siguiente Plan de Seguimiento a cumplir por la Investigadora ante el mismo:

1. Al momento de incorporar el primer paciente al estudio, se informará de haber dado inicio al protocolo de investigación antes aprobado.
2. Se informará sobre toda nueva enmienda al protocolo o al Consentimiento Informado.
3. Se informará sobre todo evento adverso observado durante la conducción del estudio.
4. En el caso de suspensión o terminación prematura del estudio, se notificará de las razones y se entregará un resumen de los resultados obtenidos hasta esa fecha.
5. Al momento de cerrar el estudio se notificará de ese cierre, y se incluirá en su informe el número de pacientes seleccionados e incluidos, así como las desviaciones del estudio realizado en el Hospital de Clínicas.
6. Cuando esté disponible el informe final de un estudio se hará llegar una copia del mismo.

OBSERVACIONES GENERALES:

- i) La aprobación del protocolo que no reciba enmiendas al mismo, a la Hoja de Información al Paciente o al Formulario de Consentimiento tendrá la validez de 1 (un) año. Esta aprobación se renovará automáticamente si no se hacen llegar observaciones.

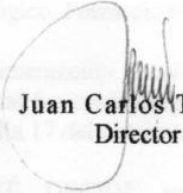
Comité de Ética del Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
COMITE DE ETICA DEL HOSPITAL DE CLINICAS
Av. Córdoba N° 2351 – Piso 11 - Ciudad de Buenos Aires - ARGENTINA



- ii) El protocolo aprobado podrá ser interrumpido en caso que se disponga de información relevante para fundamentar esa decisión.
- iii) Los procedimientos de seguimiento de la investigación cumplirán los mismos requisitos de consenso y mayoría simple adoptados para los procedimientos de decisión. El Investigador será informado por escrito de la decisión adoptada en su revisión de seguimiento y le será indicada la confirmación, modificación, suspensión o revocación de la decisión previa.


Juan Carlos Tealdi
Director