

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum* aplicados no imunodiagnóstico da ancilostomíase humana e reatividade cruzada com a estrongiloidíase.

Dayane Costa de Souza

Uberlândia-MG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum* aplicados no
imunodiagnóstico da ancelostomíase humana e reatividade cruzada com a
estrongiloidíase.**

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

Dayane Costa de Souza

Profª. Drª. Julia Maria Costa Cruz

Orientadora

Uberlândia-MG

2016

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

S729a Souza, Dayane Costa de, 1988
2016 Anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum* aplicados no imunodiagnóstico da ancilostomíase humana e reatividade cruzada com a estrongiloidíase / Dayane Costa de Souza. - 2016.
67 p. : il.

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

1. Imunologia - Teses. 2. Ancilostomíase - Teses. 3. Doenças parasitárias - Teses. 4. Antígenos - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.



Dayane Costa de Souza

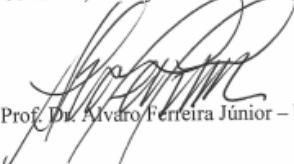
"Anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum* aplicados no imunodiagnóstico da ancilostomíase humana e reatividade cruzada com a estrongiloidíase"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

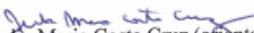
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 14 de julho de 2016.


 Prof. Dr. Alvaro Ferreira Júnior – UNIUBE

 Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga – PMU


 Profa. Dra. Juha Maria Costa Cruz (orientadora) – ICBIM/UFU

Dedico este trabalho àquela que é o meu maior exemplo de perseverança em busca do conhecimento, minha mãe, **Nora Simone Costa de Souza**, por seu incentivo e apoio constante.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu imenso cuidado e amor. Por colocar no meu caminho pessoas amigas. E por renovar minhas forças todos os dias para nunca desistir.

Aos meus pais, que sempre acreditaram que eu sou capaz. E que ao longo de toda a minha vida acadêmica me impulsionaram em direção aos grandes desafios me motivando incondicionalmente a vencer cada um deles.

À minha família, que vibrou comigo desde a aprovação até o final deste mestrado. E por compreender a minha ausência em momentos únicos. Em especial aos meus irmãos, Danielle Frota e Rodrigo Costa, pelas palavras de encorajamento e por se orgulharem de mim a cada nova conquista.

Ao meu namorado, Anderson Patrick Abtibol, que mesmo distante esteve sempre ao meu lado ajudando-me a chegar ao fim desta difícil, porém, gratificante etapa. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava.

À Prof. Dra. Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, possibilitando-me um aprendizado único. Pela cordialidade, exigência, rigor e confiança concedida.

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, a ajuda de vocês foi essencial para a realização desde trabalho. Obrigada pelas conversas, risadas e pelo companheirismo. “*Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só*”. (Amir Klink).

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, pelo ensino de qualidade e a todos os professores que fizeram parte desse caminhar.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que esta pesquisa pudesse ser concluída.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Ancilostomíase	15

1.1.1 Aspectos morfobiológicos.....	15
1.1.2 Ciclo biológico	16
1.1.3 Manifestações clínicas.....	17
1.1.4 Resposta imune na infecção por ancilostomatídeos	18
1.1.5 Diagnóstico.....	19
1.1.6 Tratamento	19
1.2 Estrongiloidíase	20
1.2.1 Aspectos morfobiológicos.....	20
1.2.2 Ciclo biológico e modo de transmissão	21
1.2.3 Manifestações clínicas.....	23
1.2.4 Resposta imune do hospedeiro	23
1.2.5 Diagnóstico.....	24
1.2.6 Tratamento	25
1.3 Reatividade cruzada entre a ancilostomíase e a estrongiloidíase	25
1.4 Anticorpos IgY	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Aspectos éticos	30
3.2 Amostras de soros humano.....	30
3.3 Galinhas e imunizações	31
3.4 Obtenção das larvas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	32
3.5 Produção de extrato salino total de larvas de filarioïdes de <i>A. ceylanicum</i>	33
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	34
3.6.1 Eletroforese do extrato salino total de <i>A. ceylanicum</i>	34
3.6.2 Eletroforese das etapas de purificação dos anticorpos IgY	35
3.7 Coleta dos ovos das galinhas e armazenamento das gemas	35
3.8 Purificação e fracionamento dos anticorpos IgY anti-larvas de <i>A. ceylanicum</i>	36
3.9 Cinética de detecção de anticorpos IgY por ELISA	39
3.10 ELISA avidez para IgY anti-larva de <i>A. ceylanicum</i>	39
3.11 ELISA para detecção de imunocomplexos em amostras soro humano.....	40
3.13 Normas de biossegurança	41
4. RESULTADOS	42

4.1 Análise do perfil eletroforético (SDS-PAGE) do extrato salino de <i>A. ceylanicum</i>	42
4.2 Coleta dos ovos das galinhas	43
4.3 Purificação dos anticorpos IgY	43
4.4 Perfil eletroforético das etapas de purificação dos anticorpos IgY	47
4.5 ELISA de cinética para detecção de anticorpos IgY	48
4.6 ELISA avidez	49
4.7 ELISA para detecção de imunocomplexo	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Valores referentes a dosagem de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) das amostras de gemas de ovo purificadas (P2)	46
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Larva filarioide (L3) de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> obtida pelo método de Baermann-Moraes utilizadas para a produção de antígeno. Os círculos destacam as principais características morfológicas da L3: A – cápsula bucal e esôfago filariforme, B – cauda pontiaguda. Aumento 40x	33
---	----

Figura 2. Esquema do processo de obtenção e armazenamento das gemas. Após todo o processo o volume restante das gemas foi congelado para uso, se necessário.....	36
---	----

Figura 3. Esquema da purificação e fracionamento dos anticorpos IgY anti-larvas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> . 1 ^a etapa – Deslipidização das gemas; 2 ^a etapa - Precipitação dos anticorpos de IgY; e 3 ^a etapa - Purificação dos anticorpos IgY. Ao fim da 2 ^a etapa, era congelado um tubo Falcon com precipitado e os outros, eram utilizados logo em seguida. Após a 3 ^a etapa, obteve-se 15 mL de amostra purificadas que foram liofilizadas e distribuídas em alíquotas.....	38
---	----

Figura 4. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% do extrato antigênico salino total de larvas filarioides (L3) de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> , corado por nitrato de prata. PM – peso molecular em kilodaltons (kDa)	42
---	----

Figura 5. A. Processo de deslipidização das gemas mostrando as frações solúveis (S1) e purificadas (P1). B. Etapa de purificação das proteínas mostrando as frações S2 e P2. Utilizou-se sulfato de amônio 20% para a precipitação dos anticorpos IgY, enriquecidos em P2.	43
---	----

Figura 6. Cromatograma da purificação dos anticorpos IgY anti-larvas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> . O pico foi eluído com fluxo de 1mL/min. Linha azul – absorbância a 280 nm, onde observa-se o pico de IgY na fração 90 e o segundo pico sendo de ovoalbumina. Linha verde – concentração do tampão fosfato.	45
--	----

Figura 7. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8% dos anticorpos IgY purificados demonstrando bandas de IgY na gema, nas frações solúveis S1 (etapa de deslipidização), nas frações purificadas P1 (etapa de deslipidização) e P2 (etapa de purificação das	
---	--

proteínas), e na amostra purificada em HPLC. Não foram observadas bandas de IgY na fração S2 47

Figura 8. ELISA de cinética para detecção de anticorpos IgY no soro das galinhas e nas gemas realizado com as amostras semanais. Os círculos indicam os picos de maior produção dos anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. Na gema os picos foram na 6^a, 8^a e 16^a semana. * - representam as imunizações..... 48

Figura 9. ELISA avidez dos anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. A porcentagem foi estimada pelo cálculo de Índice Avidez (IA). O IA inicial foi de 60% na 5^a semana após a imunização, sofreu redução para 42% na 6^a semana e atingiu seu maior valor de IA (67%) na 15^a semana. IA>75% = alta avidez; IA<75% = baixa avidez). * - representam as imunizações. 49

Figura 10. Detecção de imunocomplexo de IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum* em amostras de pacientes com ancilostomíase (n=30), estrongiloidíase (n=30), outras parasitoses (n=30) e amostras negativas. A linha pontilhada indica o *cut off* do índice ELISA (IE = 1) e a linha contínua indica a média. A significância foi calculada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. (*P < 0,05). 50

RESUMO

A ancilostomíase é considerada uma doença parasitária negligenciada causada por helmintos nematódeos pertencentes à família Ancylostomatidae. Aproximadamente 740 milhões de pessoas, no mundo, estão infectadas por este parasito. As dificuldades no diagnóstico desta parasitose podem estar relacionadas à reatividade cruzada com outros parasitos, atribuída à complexidade antigênica e proximidade filogenética. Com a finalidade de melhorar o diagnóstico da ancilostomíase humana, este estudo viabilizou a produção inédita de anticorpos IgY específicos ao *Ancylostoma ceylanicum*, destacando o fato do método ser economicamente viável, de fácil reprodução e com alto grau de rentabilidade de anticorpos. O extrato salino total de larvas filarioïdes de *A. ceylanicum* foi avaliado em eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 8% (SDS-PAGE) para caracterização do perfil proteico e posterior utilização na imunização das galinhas. As amostras purificadas de anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* apresentaram concentrações entre 8.370 µg/mL e 4.000 µg/mL. A gema pura apresentou bandas proteicas com peso de ≤ 200, 110, 80, 50 e 20 kDa. As frações P1, P2 e a amostra purificada no HPLC demonstraram bandas com pesos moleculares um pouco abaixo de ≤ 200 kDa, identificando a IgY específica. Os picos da produção de anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* ocorreram na 6^a, 8^a e 16^a semanas após imunização. A maior avidez foi detectada na 15^a semana com índice avidez de 67%. Os anticorpos foram capazes de detectar imunocomplexo em 16,6% (5/30) das amostras de soro de indivíduos com ancilostomíase. Em relação a reatividade cruzada entre os parasitos: 10% (3/30) das amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase, 6,7% (2/30) em amostras de soro com outras parasitoses e 0% nos casos negativos. Concluiu-se que o anticorpo IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* pode ser considerado uma possível ferramenta diagnóstica para a ancilostomíase, porém, mais estudos são necessários para o aprimoramento das técnicas.

Palavras-chave: antígeno heterólogo; cromatografia; fracionamento; imunização.

ABSTRACT

Antibodies IgY anti-larvae of *Ancylostoma ceylanicum* applied in immunodiagnosis of human hookworm and cross-reactivity with strongyloidiasis.

The hookworm infection is considered a neglected tropical disease (NTD) caused by nematodes belonging to Ancylostomatidae family. Approximately 740 million people worldwide are infected with this parasite. Difficulties in the diagnosis may be related to cross-reactivity with other parasites, due to the antigenic complexity and phylogenetic proximity to some species. In order to improve the diagnosis of human hookworm infection, this study enabled the unprecedented production of specific IgY antibodies against *Ancylostoma ceylanicum*, highlighting the fact that the method is economically feasible, reproducible and has high antibodies profitability. The saline extract of *A. ceylanicum* filarial larvae was evaluated in one-dimensional electrophoresis to characterize the protein profile and chickens immunization. Samples of purified anti-larvae of *A. ceylanicum* IgY showed concentrations of 8.370 µg/ml and 4.000 µg/ml. The process of IgY antibodies purification was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis 8% (SDS-PAGE). The pure yolks showed protein bands with apparent molecular weight slightly below ≤ 200, 110, 80, 50 and 20 kDa. The fractions P1 and P2, and the HPLC purified sample showed bands with molecular weights somewhat below ≤ 200 kDa, identifying the specific IgY. The peaks of the production of *A. ceylanicum* antibodies IgY anti-larvae occurred at 6th, 8th and 16th weeks after the immunizations. The higher avidity was detected at 15th week with 67% content. The antibodies were capable of detecting immunocomplexes in 16.6% (5/30) of serum samples from infected individuals with hookworm, 10% (3/30) of serum samples from individuals with strongyloidiasis, 6.7% (2/30) in serum samples with other parasitosis and 0% in negative cases. It is concluded that the *A. ceylanicum* IgY antibody anti-larvae can be considered as a possible diagnostic tool for hookworm infection, but more studies are needed to improve the techniques.

Key-words: heterologous antigen; chromatography; fractionation; immunization.

1. INTRODUÇÃO

As geo-helmintases são infecções parasitárias que apresentam grande impacto sobre a população, principalmente, em locais de baixas condições socioeconômicas. Essas parasitoses são consideradas como doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e fazem parte de programas de tratamento e controle (SARINHO et al., 2012; THOMPSON, 2015). A maioria das pessoas infectadas por geo-helmintos são crianças em idade pré-escolar e adultos residentes de áreas rurais em países da América Latina, África Subsaariana e sudeste da Ásia. A infecção por estes parasitos ocorre pela ingestão de ovos e larvas ou penetração de larvas. Geralmente em locais com falta de saneamento básico, falta de água potável, e alto índice de analfabetismo (PEARSON, 2002; PRIETO-PÉREZ et al., 2016).

A ancilostomíase é considerada uma doença parasitária negligenciada causada por helmintos nematódeos pertencentes à família Ancylostomatidae (HOTEZ et al., 2005; LEITE, 2011; NGUI et al., 2012). Apresenta alta prevalência e resulta em problema global de impacto médico, educacional e econômico (HOTEZ et al., 2008; BUNGIRO, CAPELLO, 2011; DAVEY et al., 2013; McCLURE et al., 2014; HU et al., 2015a). Aproximadamente 740 milhões de pessoas, no mundo, estão infectadas por este parasito, principalmente, nas regiões da África Subsaariana, Sudeste da Ásia, China, Brasil e América Central. Esta parasitose é causa principal da anemia ferropriva, especialmente entre mulheres grávidas e crianças, e ocasiona quadros de desnutrição e esgotamento físico e mental (WHO, 2012; BRUNET et al., 2015).

A estrongiloidíase é considerada uma parasitose de prevalência mundial com distribuição heterogênea e estima-se que de 30 a 100 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por *Strongyloides stercoralis*, porém, é importante destacar outra espécie do mesmo gênero, *S. fuelleborni*, que também causa parasitismo no homem (ASFHORD, BARNISH, 1989; BETHONY et al., 2006; FARDET et al., 2007; MARCOS et al., 2008). As áreas endêmicas estão situadas, principalmente, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento como a Ásia, América Latina e África Subsaariana (SANDOVAL et al., 2004; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; PAGE, SPEARE, 2016). Entre as infecções causadas por geo-helmintos, a estrongiloidíase está entre as seis primeiras, referindo-se apenas as infecções ativas, contudo o número de

pessoas expostas ou com quadro de infecção sub-clínico é muito maior (ELLIOT et al., 2007; NAVES, COSTA-CRUZ, 2013; SCHÄR et al., 2013).

1.1 Ancilostomíase

1.1.1 Aspectos morfobiológicos

Os ancilostomatídeos pertencem ao Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongyloidea, Família Ancylostomatidae (BLAXTER, 2000; BROOKER, BETHONY, HOTEZ, 2004; DAVEY et al., 2013).

Os vermes adultos são cilíndricos, medem aproximadamente 1,0 cm. Apresentam cutícula resistente, esbranquiçada quando fixada ou rósea quando vivos. Com extremidade cefálica recurvada dorsalmente (em forma de gancho). O dimorfismo sexual é nítido, as fêmeas terminam em cauda pontiaguda e os machos em uma bolsa copuladora. O macho das espécies é menor, medindo 8,0 mm de comprimento por 360 µm de largura e a fêmea 10,0 mm de comprimento por 440 µm de largura (BLAXTER, 2000; DAVEY et al., 2013).

As formas adultas dos ancilostomatídeos são caracterizadas por apresentarem cápsula bucal desenvolvida, com dentes ou lâminas cortantes, utilizadas para fixação na mucosa intestinal do hospedeiro, e que permite a distinção entre as espécies, além da bolsa copuladora. As principais espécies que infectam os seres humanos são: *Necator americanus* Styles (1902) que causa parasitismo gastrointestinal, e sua principal diferença morfológica entre as espécies é a presença de um par de lâminas cortantes na cápsula bucal; *Ancylostoma duodenale* Dunini (1843) apresenta cápsula bucal com dois pares de dentes grandes, corpo em forma de arco e bolsa copuladora mais larga; *Ancylostoma caninum* Ercolani (1859) apresenta três pares de dentes, bolsa copuladora larga e aberta, e quando infecta o homem causa dermatite (larva migrans); *Ancylostoma braziliense* Gomes de Faria (1910) possui apenas um par de dentes bem desenvolvidos, e na base de cada dente encontra-se outro muito pequeno situado medialmente; e *Ancylostoma ceylanicum* Loss (1911) semelhante ao *Ancylostoma braziliense*, com diferença apenas no dente medial, que é ainda menor, além da bolsa copuladora, que é mais curta.

O aparelho digestivo é composto pela boca, esôfago e intestino (na fêmea termina em ânus e no macho em cloaca). Os órgãos genitais da fêmea são formados por dois ovários, dois ovidutos e dois úteros, que se unem formando a vagina e em vulva. O

aparelho genital do macho é formado por um testículo, um canal deferente formando a vesícula seminal, continuada pelo canal ejaculador, que se abre em cloaca. Além dessas estruturas, o macho apresenta dois espículos que auxiliam na cópula (BARCANTE, 2009).

Os ovos das diferentes espécies são semelhantes, indistinguíveis ao microscópio, e eliminados nas fezes. Medem 40 por 60 μm . Apresentam formato ovoide ou elíptico com membrana fina e transparente. Os ovos começam a segmentar nas fezes, sendo possível encontrar na coproscopia ovos com oito ou mais blastômeros. Após 18 horas as larvas podem estar totalmente formadas e a eclosão pode ocorrer em um ou dois dias, desde que esteja no meio externo, com níveis adequados de oxigênio, umidade e temperatura. Os ovos já embrionados apresentam a larva de primeiro estádio (L1) no seu interior, eclodindo imediatamente e iniciando a alimentação através de matéria orgânica. Aproximadamente três dias depois sofrem a primeira muda, transformando-se em L2. Entre quatro ou cinco dias essas larvas sofrem nova muda e transformam-se em L3, mantendo sua cutícula anterior. As larvas rabditoides (L2) possuem esôfago tipo rabditoide, 400 μm de comprimento, vestíbulo bucal longo (10 μm) e primórdio genital pouco nítido. A larva filarioide (L3) apresenta esôfago filariforme, mede cerca de 500 μm , possui bainha, e cauda de ponta fina, diferente da larva de *Strongyloides* que tem cauda bifurcada (BARCANTE, 2009).

1.1.2 Ciclo biológico

A ancilostomíase humana pode ocorrer de duas maneiras: por penetração das larvas filarioides (L3) na pele ou na mucosa bucal, completando o ciclo pulmonar e intestinal; e por ingestão oral da larva filarioide por meio de alimentos ou água contaminados, onde se desenvolve apenas o ciclo em nível intestinal. A infecção no hospedeiro ocorre pela penetração ativa das L3, na pele ou mucosas, após perderem a bainha. Enzimas liberadas pela larva auxiliam na sua passagem pela pele. Em poucas horas as larvas penetram no tecido subcutâneo, em seguida, atingem a circulação sanguínea ou linfática. Seguem para o coração e depois para os pulmões, processo este que dura aproximadamente 10 dias (LEITE, 2011; PRIETO-PÉREZ et al., 2016).

Nos pulmões, as L3 penetram nos alvéolos e brônquios onde sofrem a terceira muda e transformam-se em larvas de quarto estádio (L4). As L4 possuem cápsula bucal provisória que permitem a fixação na parede do órgão. A cápsula bucal do adulto se forma

posterior e lateralmente a cápsula bucal provisória, enquanto a cutícula é liberada na muda final. Os ancilostomatídeos alcançam o estádio adulto entre duas a sete semanas, diferenciando-se em machos e fêmeas, atingindo maturidade sexual. O desenvolvimento continua e a larva é carreada, por movimentos ciliares e por muco, para a traqueia e laringe, chegando à faringe; as larvas eventualmente deglutidas alcançam o intestino. Esse trajeto ocorre em torno de três dias. Ao chegarem no intestino delgado iniciam a hematofagia e 15 dias depois sofrem a quarta muda, transformando-se em larvas de quinto estádio (L5). As larvas ingeridas com alimentos ou água realizam o ciclo da seguinte maneira: as larvas infectantes atravessam o estômago e seguem para o duodeno, onde sofrem a terceira muda e transformam-se em L4. Estas penetram na mucosa do intestino e após três ou quatro dias retornam à luz intestinal, depois de três de quatro dias sofrem a quarta muda, transformando-se em L5. Essa forma de infecção oral ocorre em *A. duodenale* e em *A. ceylanicum*. O período pré-patente ocorre desde a penetração das larvas filarioide até a eliminação dos ovos nas fezes, com variação de 35 a 60 dias para *A. duodenale*, 42 a 60 para *N. americanus*, e de 21 a 35 para *A. ceylanicum*. Para a infecção oral o período pré-patente é menor, cerca de 30 dias (MULLER, 2001; BROOKER, BETHONY, HOTEZ, 2004; LEITE, 2011; THOMPSON, 2015; PRIETO-PÉREZ et al., 2016).

1.1.3 Manifestações clínicas

O processo fisiopatológico mais importante da ancilostomíase em humanos é a perda crônica de sangue intestinal decorrente de infecções intensas devido à alta carga parasitária, de 40 a 160 vermes, suficiente para causar anemia (OSAZUWA et al., 2011; FRANCIS, KIRUNDA, ORACH, 2012). Experimentos laboratoriais têm mostrado que vermes adultos de *A. ceylanicum* podem causar perda de até 0,2 mL de sangue por dia, pela fixação à mucosa e submucosa no intestino do hospedeiro resultando em anemia por deficiência de ferro e desnutrição proteica. Enquanto as L3 causam gastroenterite eosinofílica e larva migrans cutânea em humanos (TRAUB, 2013; HU et al., 2015a).

O prurido na pele é o principal sintoma relacionado à penetração ativa das larvas infectantes, geralmente nos pés, podendo evoluir a um exantema maculopapular com duração de até duas semanas. Cerca de 10 dias após a penetração da larva, aparecem os sintomas respiratórios: tosse seca ou com expectoração e sinais da síndrome de Loeffler. Quando a infecção apresenta alta carga parasitária pode-se observar: desconforto

abdominal, anorexia, náuseas e vômitos, cólicas, diarreia (rara), febre, cansaço e perda de peso. Em crianças pode evoluir para um quadro de anemia grave, com dilatação cardíaca, insuficiência circulatória e até mesmo, a morte (BROOKER, BETHONY, HOTEZ, 2004; WISNIEWSKI et al., 2016).

Na forma crônica da doença o quadro clínico mais comum é a anemia ferropriva. Os sinais e sintomas clássicos são palidez, mucosas descoradas, cansaço, desânimo e franqueza; tontura, vertigem, dores musculares principalmente nas pernas, e cefaleia. Nas crianças, os desenvolvimentos físico e mental são comprometidos; crescimento e peso insuficiente; apetite reduzido; e baixo rendimento escolar devido à falta de atenção e apatia (HAAS, BROWNLIE, 2001; CHAMI et al., 2015; ROBERTS, 2016).

1.1.4 Resposta imune na infecção por ancilostomatídeos

Sabe-se que, os ancilostomatídeos secretam moléculas imunomoduladoras atenuando seletivamente as respostas imunes do hospedeiro promovendo assim a sua sobrevivência em longo prazo (LOUKAS, PROCIV, 2001; FUJIWARA et al., 2006).

Devido ao complexo ciclo de vida do parasito a interação parasito-hospedeiro apresenta diversas possibilidades a nível molecular. Desse modo, o contato com as barreiras naturais do hospedeiro, expõem-no a uma diversidade antigênica (LOUKAS, PROCIV, 2001). Modelos experimentais infectados com *A. ceylanicum* e *Nippostrongylus brasiliensis* têm sido utilizados para compreender a resposta imune do hospedeiro referente à proteção e susceptibilidade (BUNGIRO et al., 2008; MEERA, De'BROSKI, 2016).

O sistema imunológico responde a infecção logo após a penetração das larvas infectantes (L3), através da pele do hospedeiro. Após estas larvas entrarem na corrente sanguínea, inicia-se uma nova etapa no sistema imune sendo caracterizada pela produção elevada de imunoglobulinas (Ig), principalmente IgG e IgE no soro; e eosinofilia sistêmica (LOUKAS, CONSTANT, BETHONY, 2006). Ao entrar no trato pulmonar, ocorre uma resposta de perfil Th2 que induz a produção de células linfoides inatas (ILC2) e macrófagos (M2) responsáveis por limitar o crescimento do parasito e reduzir o dano causado pela infecção (MEERA, De'BROSKI, 2016).

A infecção por esses parasitos induz uma resposta imune mista de perfil Th1 com produção de citocinas, IFN- γ e IL-12, e perfil Th2 com produção de IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 e IL-33, bem como, linfopoetina estromal tímica (TSLP), eosinófilos, mastócitos,

basófilos e metaloproteínases (GEIGER et al., 2004; QUINNELL et al., 2004; MEERA, De'BROSKI, 2016).

1.1.5 Diagnóstico

Em geral, o diagnóstico clínico é obtido a partir da anamnese, associação de sinais e sintomas. O diagnóstico laboratorial é realizado pelos achados de ovos no exame parasitológico de fezes (EPF), por método de sedimentação espontânea Hoffmann, Pons e Janer (1934), flutuação espontânea Willis (1921), podendo ser realizado também a contagem de ovos por Kato-Katz, 1972 (KATO, MIURA, 1954), teste quali-quantitativo para ovos de helmintos (HOTEZ et al., 2005; LEITE, 2011).

Como a identificação morfológica das espécies de ancilostomatídeos é difícil de ser realizada por meio dos exames parasitológicos, o diagnóstico molecular por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizando amostras de fezes, pode ser realizado como teste complementar. O copro-PCR, é uma técnica aplicada para a detecção multiplex de DNA das espécies de *Ancylostoma* e de *N. americanus* (TRAUB et al., 2008; SATO et al., 2010; HU et al., 2015b).

1.1.6 Tratamento

O tratamento da ancilostomíase é realizado com Pamoato de Pirantel, Mebendazol e Albendazol (REY, 2010; TREGER et al., 2014). O uso dos benzimidazóis é contraindicado em casos de gravidez, mas, em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS), concluiu que lactantes e grávidas são consideradas grupos de alto risco no que diz respeito às consequências causadas pela infecção e devem ser incluídas nas campanhas de tratamento. Além do tratamento anti-helmíntico é necessário a reposição de ferro (sulfato ferroso), pois permite que o paciente com anemia tenha uma recuperação clínica mais rápida. De forma complementar ao tratamento, é indicado que este paciente mantenha dieta alimentar rica em ferro (KEISER, UTZINGER, 2008; REY, 2010; FLORES et al., 2015). O tratamento não impede casos de reinfecção, pois, mesmo sendo tratado o homem continua exposto aos locais contaminados, que garantem um novo ciclo de infecção (GEIGER et al., 2004; QUINNELL et al., 2004).

1.2 Estrongiloidíase

1.2.1 Aspectos morfobiológicos

As espécies do gênero *Strongyloides* Grassi (1879) são encontrados em mamíferos, e também em algumas aves, anfíbios e répteis (LEVINE, 1979). Entre as mais de 50 espécies existentes, duas acometem o homem: *Strongyloides stercoralis*, com distribuição cosmopolita, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais; e *Strongyloides fuelleborni* von Linstow (1905) encontrado na África Central e Oriental, Filipinas e Ilhas da Nova Guiné. Em murinos, *Strongyloides ratti* Sandground (1925) e *S. venezuelensis* Brumpt (1934), são utilizados para o estudo da infecção humana e imunobiologia (RODRIGUES et al., 2007; VINEY, LOK, 2015).

Esses parasitos são os únicos nematoides do homem capazes de realizar ciclo evolutivo duplo. As fêmeas são partenogenéticas, estão presentes no intestino delgado e se reproduzem no hospedeiro sem a presença do macho (GROVE, 1996; ANDERSON, 2000).

A fêmea parasita partenogenética tem aspecto filiforme com a extremidade posterior afilada. Mede de 1,7 a 2,5 mm de comprimento por 0,03 a 0,04 mm de largura e têm a extremidade anterior fina. Apresenta cutícula delgada, com estriações transversais. O aparelho digestivo é formado por boca trilabiada, esôfago longo e cilíndrico do tipo filarioide. O orifício anal encontra-se em posição transversal na extremidade posterior. A vulva está posicionada no terço médio do corpo; o útero anfidelfo; os ovários que dependendo da espécie, são espiralados com o intestino; e ovidutos com ovos enfileirados no seu interior (MORAES, 1948; VINEY, LOK, 2015).

A fêmea de vida livre é fusiforme e tem a porção posterior afilada. Possue a extremidade posterior afilada e medem aproximadamente 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de largura. A cutícula é fina e com leves estrias marcando-a transversalmente; nessa forma evolutiva, o aparelho digestivo também é simples e formado por boca pequena, esôfago curto e rabditoide, intestino simples e ânus próximo à extremidade posterior. O aparelho genital é organizado em vulva, útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal. O número de ovos no interior do útero é maior em relação à fêmea parasita (COSTA-CRUZ, 2011; VINEY, LOK, 2015).

O macho de vida livre é menor que as fêmeas. Mede aproximadamente de 0,7 a 0,9 mm de comprimento por 0,04 mm de largura. Tem revestimento similar ao das

fêmeas. O sistema digestório é organizado em boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino simples terminado em cloaca na região caudal. A cauda é recurvada ventralmente e apresenta dois espículos copulatórios, sustentados pelo gubernáculo. A genitália é constituída pelos testículos, vesícula seminal e canais deferente e ejaculador (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; VINEY, LOK, 2015).

As larvas rabditoides (L1 e L2) medem cerca de 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de largura. Possuem cutícula delicada e hialina recobrindo-as. A boca é pequena e o esôfago é do tipo rabditoide, com dilatações bulbiformes nas extremidades e constrição na parte mediana. O intestino termina em abertura anal espaçada da extremidade posterior. Observa-se também um primórdio genital nítido formado por um aglomerado de células (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2011).

A larva filarioide (infectante) é alongada e fina. Mede de 0,35 a 0,5 mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de largura. Apresenta cutícula fina e estriada e cauda entalhada ou bifurcada, detalhe característico. O vestíbulo bucal é curto, o esôfago filarioide e o intestino longo e estreito com abertura anal posterior (COSTA-CRUZ, 2011; VINEY, LOCK, 2015).

Os ovos das fêmeas partenogenéticas e de vida livre são semelhantes, com diferença apenas no tamanho, sendo os das últimas maiores. Possuem estruturas elipsoides, de parede translúcida e assemelham-se aos ovos de ancilostomatídeos (MORAES, 1948; GROVE, 1996; VINEY, 2006).

1.2.2 Ciclo biológico e modo de transmissão

Os parasitos do gênero *Strongyloides* possuem ciclos evolutivos complexos, seis formas evolutivas, parasitas adultos e de vida livre e morfologia distinta. Grande parte desses helmintos apresenta a habilidade de se manter alternando gerações homogêneas ou diretas em ciclos parasitários; heterogênicas ou indiretas, em repetidas famílias de vida livre (GROVE, 1996).

A partir das larvas rabditoides eliminadas nas fezes podem ocorrer dois ciclos evolutivos: 1- direto ou partenogenético, no qual as larvas rabditoides (L1/L2) chegam ao meio externo pelas fezes, transformando-se em larvas filarioides infectantes (L3); 2- indireto ou de vida livre, no qual as larvas rabditoides transformam-se em fêmeas e machos de vida livre, que por reprodução sexuada, dão origem as larvas filarioides infectantes (L3) (GROVE, 1996).

A transmissão, no ciclo direto, em humanos por *S. stercoralis* ocorre quando as larvas filarioïdes (L3) penetram ativamente a pele ou mucosas da boca ao ingerir alimentos contaminados. Após a penetração, as L3 entram na circulação sanguínea, passam pelo ventrículo direito, chegam aos capilares pulmonares onde se diferenciam em L4, atravessam a membrana alveolar, migrando pela árvore brônquica até a faringe. Logo após, as L4 podem ser expelidas pela tosse que provocam, ou ser deglutidas. Quando ingeridas atingem o intestino, instalaram-se no duodeno e jejuno, chegando à maturidade como fêmeas partenogenéticas (MORAES, 1948; REY, 2010). Os ovos de *S. stercoralis* são eliminados larvados na mucosa intestinal e eclodem antes da eliminação das fezes, tornando-se de difícil visualização no exame microscópico de fezes de humanos infectados, com exceção de indivíduos que apresentem quadros de diarreia grave. O período pré-patente de *S. stercoralis* em humanos é de aproximadamente 8 a 25 dias (COSTA-CRUZ, 2011).

Devido à persistência da infecção por longos períodos de tempo, o parasita tem como capacidade a autoinfecção, na qual a larva filarioïde (L3) pode penetrar no intestino ou nas regiões perineal ou perianal, alcançando a circulação venosa ou linfática e assim perpetuando o ciclo biológico sem novas exposições (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011; BRELOER, ABRAHAM, 2016).

A contaminação do solo ocorre devido à falta de condições sanitárias adequadas, o que leva ao frequente hábito de defecar no chão. Para viabilizar a sobrevivência das larvas rabditoides e para que estas se desenvolvam em machos e fêmeas de vida livre é necessário que o substrato seja arenoso, úmido, poroso, aquecido com luz solar indireta e rico em matéria orgânica. A temperatura deve variar entre 25° a 30 °C, a evolução torna-se lenta entre 11° e 19 °C, e abaixo de 8 °C as larvas rabditoides são inviáveis (MORAES, 1948; THOMPSON et al., 2005; COSTA-CRUZ, 2011).

A autoinfecção ocorre de duas maneiras: primeira, autoinfecção externa quando a L2, na região perianal, transforma-se em L3 e penetra nesta região. Segunda, autoinfecção interna, quando L2 ainda na mucosa intestinal, transforma-se em L3 penetrando na região do íleo e cólon, aumentando assim a carga parasitária. Esta autoinfecção é responsável pela longa permanência do parasita no hospedeiro, sendo o principal fator no desenvolvimento das formas graves da estrongiloidíase (VINEY, LOCK, 2015).

1.2.3 Manifestações clínicas

Aproximadamente 50% dos indivíduos infectados com *S. stercoralis* são assintomáticos. Quando há sintomas, estes são variáveis e provavelmente decorrentes da presença de formas evolutivas, sobretudo no intestino. Dor epigástrica, diarreia, náuseas, vômitos, constipação e perda de peso são as principais manifestações clínicas desta infecção parasitária (CONCHA, HARRINGTON, ROGERS, 2005; PRIETO-PÉREZ et al., 2016). Nas formas graves da doença, o parasito pode ser encontrado em vários órgãos como: fígado, pulmão, coração e sistema nervoso central. Nos casos mais graves há possibilidade de ocorrer broncopneumonia e abscessos associados a infecções bacterianas (FARDET et al., 2007; BUONFRATE et al., 2013).

Clinicamente, a forma aguda da doença é pouco detectada em áreas endêmicas e as manifestações clínicas são decorrentes da penetração da larva pela pele e de sua migração, causando erupção eritêmato-papulosa, pruriginosa, conhecida como *larva currens*. A forma crônica pode ser leve, moderada ou grave; quando é leve, geralmente é assintomática. Nas formas moderada e grave podem ser reportados sinais e sintomas cutâneos, pulmonares, gastrointestinais, havendo predomínio de manifestações digestivas como mencionado acima. As manifestações são mais intensas nos casos de disseminação, podendo levar a desidratação, síndrome de má absorção, isquemia mesentérica, distúrbios hidroeletrolíticos, hipoalbuminemia e, em alguns casos, a íleo paralítico e obstrução intestinal. Quando há envolvimento pulmonar ocorre tosse e hemoptise, decorrentes da migração larval (VADLAMUDI, CHI, KRISHNASWAMY, 2006; VELOSO, PORTO, MORAES, 2008; NUTMAN, 2016).

1.2.4 Resposta imune do hospedeiro

Os helmintos estimulam no hospedeiro resposta dependente de linfócitos T CD4+ com perfil Th2 que produzem citocinas caracterizadas pelas IL-3, estimulação de basófilos; IL-4, estimulação de basófilos e células B para produção de anticorpos IgE e IgG1; IL-5, atração e indução de eosinófilos e indução de IgA; IL-6, estimulação de granulócitos e células T e B; IL-10, IL-13 modulação negativa da resposta Th1 – envolvidas na sinalização das células. As moléculas pró-inflamatórias inespecíficas como TNF- α e IL-1 favorecem a proliferação das células caliciformes, provocando aumento na

secreção de muco, tendo como objetivo a eliminação do parasito (ARAUJO et al., 2016; BRELOER, ABRAHAM, 2016; NUTMAN, 2016;).

Os hospedeiros infectados com *Strongyloides* sp. apresentam uma resposta de perfil Th2 induzindo a produção de IgM, IgA, IgG, e principalmente IgG1 e IgE. A IgG total é um bom marcador para diagnóstico sorológico, seguido da IgA e IgE. Em casos crônicos com autoinfecção, o controle da imunidade ocorre pela presença das IgA modulando a liberação larvária; IgE regulando a auto-infecção e IgG4 podendo bloquear a ação de IgE (ROSSI et al., 1993; RODRIGUES et al., 2007; BRELOER, ABRAHAM, 2016; NUTMAN, 2016).

1.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da estrongiloidíase é incerto, pois a maioria das infecções é assintomática. Tendo em vista que os sintomas pulmonares e intestinais são comuns à outras parasitoses, torna-se necessário a realização de exames parasitológicos e imunológicos complementares (LIU, WELLER, 1993; ANAMNART et al., 2010; COSTA-CRUZ, 2011; REPETTO et al., 2016).

O diagnóstico definitivo da estrongiloidíase geralmente é realizado por métodos parasitológicos que consistem na identificação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes. Em grande parte dos casos a eliminação das larvas é pequena e irregular, dificultando o diagnóstico da infecção. As técnicas mais comuns para identificação de larvas em amostras de fezes são: método de concentração formol-éter (RITCHIE, 1948), método de Baermann-Moraes e suas variações (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), concentração por sedimentação Hoffmann, Pons e Janer (1934), cultura em placa de ágar (ARAKAKI et al., 1988) e método de Harada-Mori (HARADA, MORI, 1955).

Os métodos de diagnóstico imunológico apresentam alta sensibilidade e são de grande utilidade na avaliação da resposta imune do hospedeiro em casos assintomáticos proporcionando esclarecimento de diagnóstico clínico e epidemiológico (RODRIGUES et al., 2007; MACHADO et al., 2008; POLANCO, GUIÉRREZ, ARIAS, 2013; FELICIANO et al., 2014; LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014; REPETTO et al., 2016).

As principais técnicas sorológicas utilizadas para o diagnóstico da estrongiloidíase são: *immunofluorescence antibody test* (IFAT), direcionado para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos com variações nas preparações antigênicas; *enzyme-linked*

immunosorbent assay (ELISA) que é considerado superior aos outros testes sorológicos, sua sensibilidade varia de 85% a 95% e a especificidade pode chegar a 90%; e *Western blotting*, considerado como altamente sensível e específico no reconhecimento de frações protéicas imunodominantes em *Strongyloides* (SUDRÉ et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; VAN DOORN et al., 2007; RIGO et al., 2008; MOTA-FERREIRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2011; POLANCO, GUTIÉRREZ, ARIAS, 2013; RASCOE et al., 2015).

1.2.6 Tratamento

O tratamento é baseado na administração de Tiabendazol e Albendazol, mas apresentam vários efeitos adversos e são pouco eficazes para controle da endemia, desta forma a ivermectina, droga inicialmente utilizada na medicina veterinária, tem sido a mais empregada, sendo bastante efetiva e segura no controle de doenças endêmicas como a estrongiloidíase humana (MILLER, CHURCH, SALGADO, 2008; BISOFFI et al., 2011; BUONFRATE, GOBBI, 2016).

Mesmo após o tratamento pode ocorrer a persistência de larvas indicando a sobrevivência de algumas fêmeas. Deste modo, o indivíduo estará sujeito a reinfecção e volta mostrar parasitismo completo depois de uma a quatro semanas. Nestes casos, é importante repetir o tratamento para destruir os novos parasitos adultos (FERREIRA et al., 1999; ZAHA et al., 2000).

1.3 Reatividade cruzada entre a ancilostomíase e a estrongiloidíase

A sensibilidade do diagnóstico utilizando a técnica de microscópica convencional é baixa e técnicos de laboratório experientes são necessários para diferenciar larvas de *S. stercoralis* e ancilostomatídeos uma vez que a morfologia de ambos os parasitos é semelhante (BECKER et al., 2015).

Em alguns estudos foi demonstrado pelo IFAT e ELISA a reatividade cruzada de *Strongyloides* com *Schistosoma mansoni*, filarias e *Ascaris lumbricoides* (COSTA-CRUZ et al., 1997; PAULA et al., 2000; SIDDIQUI, BERK, 2001). Desta forma, a caracterização e identificação de抗ígenos específicos para *A. ceylanicum* se faz necessária para o incremento da especificidade dos testes, especialmente, nos mais utilizados – ELISA e *Immunoblotting* (SILVA et al., 2003; SUDRÉ et al., 2006).

Ancylostoma ceylanicum é uma das espécies parasitárias que produz infecções no homem, e, isto vem sendo demonstrado em experimentos laboratoriais (WIJERS, SMIT, 1966; CARROL, GROVE, 1986). A manutenção da cepa vem sendo realizada em hamsters *Mesocricetus auratus*, adequado modelo experimental para realização de estudos da ancilostomíase humana, avaliação de drogas para o tratamento das geo-helmintíases, potencial vacinal contra a ancilostomíase e caracterização molecular das espécies (FAIRFAX, HARRISON, CAPPELLO, 2014; KEISER et al., 2016; WISNIEWSKI et al., 2016). Uma vantagem adicional é seu custo relativamente baixo em comparação com outros modelos animais para ancilostomíase, como os cães (KLEMENT et al., 1996).

Antígenos heterólogos (*S. venezuelensis* e *S. ratti*) vem sendo utilizados no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana auxiliando na padronização de novas técnicas de imunodiagnóstico, nas pesquisas referentes à biologia molecular, na terapêutica e nos aspectos da interação parasito-hospedeiro (MACHADO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010). Outro fator importante é a viabilidade de manutenção das cepas em roedores de laboratório (*Rattus norvegicus*) de linhagem *Wistar*. Com relação ao *S. venezuelensis*, a coprocultura não oferece risco de contaminação helmíntica para os manipuladores e o tempo na estufa é reduzido. Deste modo, pode-se manter a produção de antígenos heterólogos em laboratório de forma segura e constante (FELICIANO et al., 2010; LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014).

1.4 Anticorpos IgY

Em 1893, Klemperer demonstrou que a imunização de uma ave resultou na transferência de anticorpos específicos do soro para a gema do ovo. A partir dos anos 80, quase cem anos depois, quando o bem-estar do animal tornou-se prioridade no meio científico, os resultados de Klemperer atraíram uma grande atenção. Justifica-se, portanto, o uso de galinhas poedeiras no processo de produção de anticorpos policlonais, fato que diminui a necessidade de procedimentos mais invasivos. Quanto ao rendimento, o emprego desta metodologia implica na redução no número de animais usados, pois a produção dos anticorpos nas aves poedeiras é quase dez vezes maior que em coelhos (SVENDSEN et al., 1995).

As imunoglobulinas Y são moléculas que apresentam elevada especificidade para ligação e inativação de moléculas tóxicas e antigênicas capazes de invadir o organismo.

IgY está predominante no soro de aves, répteis e anfíbios (LESLIE, CLEM, 1969). Apresenta funções semelhantes à IgG de mamíferos, sendo homóloga à IgA e IgM (WARR, MAGOR, HIGGINS, 1995; ZHANG, 2003). As IgY são secretadas para o sangue e transferidas para a gema do ovo, enquanto IgA e IgM são depositadas na clara do ovo em quantidades limitadas (CARLANDER et al., 2000; DAVALOS-PANTOJA et al., 2000; GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015).

Os pesos moleculares, a morfologia e o perfil eletroforético são semelhantes aos anticorpos dos mamíferos. A estrutura geral destes anticorpos consiste de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. O peso molecular (PM) da IgY foi encontrado por espectrometria de massa de aproximadamente 180 kDa, enquanto o de IgG de mamíferos é de 150 kDa, aproximadamente (WARR, MAGOR, HIGGINS, 1995; SUN et al., 2001; COVA, 2005; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012; GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015). A IgY apresenta quatro domínios constantes da cadeia pesada enquanto a IgG apresenta três. Existe discreta homologia entre o terceiro e quarto domínio da cadeia pesada da IgY com o segundo e o terceiro da IgG. Acredita-se que o segundo domínio da cadeia pesada da IgY represente a região de dobradiça da IgG, sendo essa região menos desenvolvida na IgY, o que pode resultar em uma flexibilidade reduzida da região Fab, possível razão para algumas diferenças entre IgY e IgG no reconhecimento do epítopo. Assim como para IgG, a região Fc da IgY é o sítio de maiores funções biológicas desenvolvidas. Contém duas cadeias laterais de carboidratos, em contraste com apenas uma da IgG (WARR, MAGOR, HIGGINS, 1995; SCHADE et al., 2005).

Diferentemente da IgG, a IgY não ativa o complemento, não se liga às proteínas estafilocólica A e estreptocócica G, ao fator reumatóide e ao receptor Fc da superfície celular (LEE et al., 2002; JIANG, DIRAVIYAM, ZHANG, 2016). Não reage com os anticorpos mamíferos IgG e IgM, fato que possibilita diversas formas de utilização para reduzir reações indesejadas em ensaios usando anticorpos anti-IgG (CARLANDER et al., 2000; TINI et al., 2002; ZHANG, 2003; JIANG, DIRAVIYAM, ZHANG, 2016).

A tecnologia de IgY apresenta também melhor viabilidade econômica quando comparada à outras técnicas utilizadas na extração de anticorpos de mamíferos. As galinhas (*Gallus gallus domesticus*), animais utilizados nessa técnica, têm menor custo e são de fácil manipulação e as imunoglobulinas são coletadas da gema dos ovos após imunização. A produção e isolamento de IgY são rápidos e simples, sendo necessária apenas uma pequena quantidade de antígeno (0.1-1 mg) na imunização para obter um longo período de títulos de anticorpos e consequentemente altas taxas deles (ERHARD

et al., 2000; TINI et al., 2002; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012; MARCQ, MARLIER, BECKERS, 2015).

A produção de anticorpos IgY específicos podem ser alcançados pela imunização de aves poedeiras com o antígeno ou extrato antigênico alvos. O antígeno pode ser apresentado ao sistema imune como estruturas complexas (bactéria, vírus e parasitas) ou simples (proteínas, polissacarídeos e toxinas). Contudo, o resultado da imunização pode não ser muito previsível. Dois fatores importantes influenciam esta resposta: tipo de adjuvante usado e a via de administração do antígeno. Animais utilizados para a produção de anticorpos por mais de três meses precisam de várias imunizações, com intervalo de 4-8 semanas, para assegurar um alto nível de produção dos anticorpos (TU, CHEN, CHANG, 2001; TINI et al., 2002; SCHADE et al., 2005; SILVA, TAMBOURGI, 2010).

O adjuvante considerado padrão ouro em termos de indução da resposta imune específica é o adjuvante completo de Freund (CFA). Porém, recentemente, o CFA está sendo usado com menos frequência, pois tem sido associado à inflamação severa e necrose tecidual no local da inoculação. O substituto mais efetivo encontrado foi o adjuvante incompleto de Freund (IFA), que atualmente é o mais usado para produção de imunoglobulinas específicas (WANKE et al., 1996; LÉVESQUE, MARTINEZ, FAIRBROTHER, 2007; CHALGHOUMI et al., 2009).

A idade das aves (25 semanas) coincide com o início da postura e a quantidade total de IgY na gema do ovo é relativamente constante. De cada 1 mL de gema é possível obter de 4-10 µg/IgY, independente, da raça, da cor, do peso do ovo, da produção do ovo ou período experimental (LI et al., 1998; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2012).

Uma das principais necessidades da pesquisa é a geração de anticorpos específicos a antígenos de forma rápida, não invasiva e com elevada relação custo benefício, e que possam ser aplicados amplamente no diagnóstico e na imunoterapia de diversas doenças (STOCKWIN, HOLMES, 2003).

2. OBJETIVOS

- Induzir resposta imune humoral em galinhas de postura contra alvos antigênicos do extrato salino total de larvas de *A. ceylanicum* para a produção de anticorpos IgY específicos anti-larvas de *A. ceylanicum*.
- Extrair anticorpos IgY policlonais da gema de ovos de galinhas imunizadas com antígenos proteicos derivados do extrato total de larvas de *A. ceylanicum*;
- Determinar a cinética e avidez dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*;
- Aplicar os anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* purificados no reconhecimento de imunocomplexo em soro de pacientes com ancilostomíase e reatividade cruzada com estrongiloidíase e outras parasitoses humanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os experimentos foram realizados seguindo as normas recomendadas, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFU (CAAE-48492315.8.0000.5152)

A cepa de *A. ceylanicum* foi mantida no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Parecer CETEA 066/2008) e em seguida as larvas (L3) foram cedidas gentilmente pela Profª. Drª. Elida Mara Leite Rabelo. A cepa de *S. venezuelensis* foi mantida em ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) no Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (CBEA) da UFU, sob aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais/UFU (CEUA/UFU) - protocolo de Nº 075/2008.

As galinhas foram imunizadas e mantidas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior, Médico Veterinário CRMV-MG 4325, no Laboratório de Experimentação Veterinária do Instituto de Estudos Avançados em Veterinária José Caetano Borges da Universidade de Uberaba (UNIUBE) em Uberaba-MG.

As amostras de soros utilizadas neste estudo encontram-se armazenadas no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) - protocolo de Nº 04/2008.

3.2 Amostras de soros humano

Utilizaram-se 120 amostras de soro humano para detecção de imunocomplexo, conforme item 3.11. Estas amostras foram divididas em quatro grupos:

Grupo I - 30 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico parasitológico positivo para ancilostomíase;

Grupo II - 30 amostras de soros de indivíduos com diagnóstico parasitológico positivo para estrongiloidíase;

Grupo III - 30 amostras de soro de indivíduos com diagnóstico parasitológico positivo para outras doenças parasitárias intestinais incluindo *Ascaris lumbricoides* (n=5), *Enterobius vermicularis* (n=5), *Hymenolepis nana* (n=5), *Taenia* sp. (n=5), *Giardia lamblia* (n=5), *Schistosoma mansoni* (n=5). Estas amostras de soro foram negativas para ancilostomíase e estrongiloidíase.

Grupo IV - 30 amostras de soros de indivíduos saudáveis com diagnóstico parasitológico negativo.

Todas as amostras de soros foram provenientes de indivíduos submetidos a exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras de cada indivíduo, pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e o método de Hoffmann; Pons; Janer (1934).

3.3 Galinhas e imunizações

Foram utilizadas quatro galinhas jovens, em início de fase de postura (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Hisex (brancas e marrons; a cor não interfere na produção dos anticorpos), com 25 semanas de idade para a produção de anticorpos IgY policlonais. As galinhas foram alojadas, individualmente, em gaiolas de arame suspensas com água e ração *ad libitum*, e divididas em dois grupos de acordo com as imunizações e a especificidade dos anticorpos IgY produzidos:

Grupo I – duas galinhas imunizadas com extrato salino total de larvas de *A. ceylanicum*;

Grupo II – duas galinhas imunizadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Para a produção de anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* as galinhas foram imunizadas conforme a metodologia proposta por Schwarzkopf et al. (2001). Foram realizadas oito imunizações em um intervalo de 14 dias, via intramuscular, profunda, em diferentes pontos do músculo peitoral. Em seguida, foi realizado o monitoramento das galinhas para a detecção de processos inflamatórios ou de efeitos adversos na quantidade de ovos produzidos. As imunizações ocorreram da seguinte maneira:

1^a imunização - volume total de 500µl (250µl de antígenos em PBS com concentração proteica de 100µg + 250µl de adjuvante completo de Freund) (Sigma-Aldrich, EUA);

2^a imunização - volume total de 500µl (250µl de antígenos em PBS com concentração proteica de 100µg + 250µl de adjuvante incompleto de Freund) (Sigma-Aldrich, EUA);

3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a e 8^a imunizações - idênticas a segunda imunização.

As galinhas do grupo controle foram imunizadas da mesma forma, com substituição dos antígenos parasitários por PBS 0,01 M. Ao final dos experimentos, as galinhas foram eutanasiadas com uma superdosagem de anestésico tiopental, administrado via intraperitoneal 60mg/kg.

3.4 Obtenção das larvas de *Ancylostoma ceylanicum*

Para obtenção das larvas foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com idade de quatro semanas, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). As fezes dos hamsters infectados foram recolhidas, amolecidas com água e homogeneizadas com vermiculita para realização da coprocultura, que foi mantida a 27 °C por 7 dias. Após este período, as larvas filarioïdes (L3) - Figura 1 obtidas foram recuperadas pelo Método de Rugai (1954) adaptado ou Baermann-Moraes (1917). As larvas recuperadas foram centrifugadas (2.000 rpm) entre 4 e 5 vezes por 1 min com PBS 0,01 M para limpeza. A viabilidade das larvas para produção do antígeno foi observada em uma lupa, coradas posteriormente com lugol, e contabilizadas com o auxílio de um contador de células (BARCANTE et al., 2003).



Figura 1. Larva filarioide (L3) de *Ancylostoma ceylanicum* obtida pelo método de Baermann-Moraes utilizadas para a produção de antígeno. Os círculos destacam as principais características morfológicas da L3: A – cápsula bucal e esôfago filariforme, B – cauda pontiaguda. Aumento 40x.

3.5 Produção de extrato salino total de larvas de filarioídeos de *A. ceylanicum*

Para a produção dos extratos salinos totais foram utilizadas 100.000 L3 de *A. ceylanicum* de acordo com Gonzaga et al. (2013). As larvas foram ressuspensas em PBS pH 7,2 contendo inibidores de protease (Complete Ultra Tabletes, Mini, EASYpack - Roche) e rompidas em quatro ciclos de congelamento com nitrogênio líquido (1 min, -196 °C) e descongelamento (37 °C). Após um período de incubação por 2 horas a 4 °C sob agitação continua, a suspensão foi centrifugada (12.400 g, 30 min, 4 °C) e o sobrenadante foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951), aliquotado e armazenado a -20 °C.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.6.1 Eletroforese do extrato salino total de *A. ceylanicum*

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) 12% foi realizada para analisar o perfil proteico do extrato salino de *A. ceylanicum*. O extrato antigênico e o padrão de peso molecular (Sigma Aldrich, EUA) foram submetidos à SDS-PAGE sob condições desnaturantes não redutoras de acordo com Laemmli (1970). O gel foi preparado no aparato de eletroforese vertical para mini-gel (SE 250, GE Healthcare, EUA) contendo tampão Tris-glicina a 0,025 M, pH 8,3 e a migração das proteínas foi realizada em corrente de 20 mA por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos.

O gel de separação foi preparado utilizando: Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 (Vetec); SDS (Pharmacia, EUA) a 0,1%; EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético, Gibco-Brl, EUA) a 2 mM; solução de acrilamida (Pharmacia, EUA) a 30%; bisacrilamida (N,N'-metíleno-bis-acrilamida, Sigma, EUA); água destilada; TEMED (N,N,N,N-tetrametil-amonometano, Sigma) a 0,125% e APS (persulfato de amônio, Vetec, RJ, Brasil) a 0,125%. Após o preparo, o gel foi adicionado entre as placas lentamente, para evitar polimerização.

Posteriormente, foi preparado o gel de empilhamento com Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; EDTA 2 mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida a 1%; água destilada; TEMED a 0,125% e APS a 0,125%. Em seguida, o gel de empilhamento foi depositado sobre o gel de separação foram feitos os moldes, com espaçadores, para a formação dos poços de aplicação das amostras.

Após a polimerização completa, foram aplicadas 20 µl das amostras antigênicas por poço diluídas na proporção de 1:9 em tampão de amostra (TRIS-HCl 0,1 M, pH 6,8; SDS 4%, glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2% e água destilada). O gel foi corado com nitrato de prata (AgNO_3 , Merck, EUA) pelo Método de Friedman (1982).

Por fim, o gel foi digitalizado em *scanner* para registro. E as frações proteicas foram analisadas de acordo com Gassmann et al., (2009) utilizando o software Image J versão 1.47 (National of Health, EUA).

3.6.2 Eletroforese das etapas de purificação dos anticorpos IgY

A avaliação das etapas de purificação dos anticorpos IgY foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições não redutoras conforme Laemmli (1970). O gel foi preparado no suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical para mini-gel (SE 250, GE Healthcare, Piscataway, EUA) contendo tampão Tris-glicina a 0,025 M pH 8,3 e a migração das proteínas foi realizada em corrente de 20 mA/gel por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Alíquotas de 10 µg de proteína foram analisadas em gel de concentração 8% (tampão Tris-HCl 0,375M pH 8,8; dodecilsulfato de sódio [SDS] 0,1%, EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida 29:1; tetrametilelenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%). Para identificação do peso aparente das proteínas, foi utilizado um marcador de peso molecular (BenchMarkTM Protein Ladder). As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant blue 250R* (Sigma).

3.7 Coleta dos ovos das galinhas e armazenamento das gemas

A coleta dos ovos das galinhas iniciou uma semana antes das imunizações e manteve-se por 16 semanas após a imunização primária. Todos os ovos foram coletados, identificados de acordo com o grupo de imunizações e semana da coleta, e em seguida, foram armazenados a 4°C. As gemas foram coletadas da seguinte maneira: as cascas dos ovos foram higienizadas com álcool 70%, logo depois a casca foi quebrada e as gemas foram separadas das claras sem ruptura da membrana vitelínica; as gemas integrais foram lavadas com PBS para remoção dos resquícios de clara e posteriormente a membrana vitelínica foi rompida. Em seguida, o volume total das gemas, *pool* semanal, foi mensurado, aproximadamente 10 mL de gema de cada ovo, e, separado apenas 40 mL para serem utilizados imediatamente para extração dos anticorpos IgY específicos. O restante foi armazenado em tubos tipo Falcon a -20 °C (Figura 2).

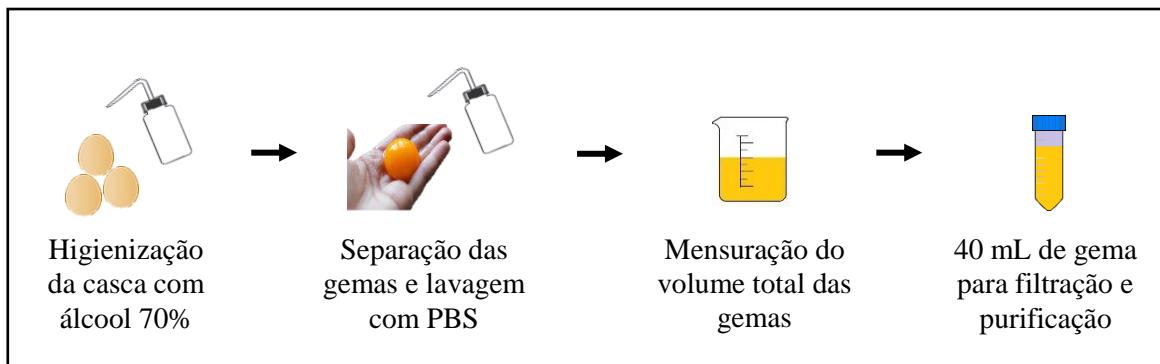


Figura 2. Esquema do processo de obtenção e armazenamento das gemas. Após todo o processo o volume restante das gemas foi congelado para uso, se necessário.

3.8 Purificação e fracionamento dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*

Todas as etapas da purificação dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* estão representadas na Figura 3. A primeira etapa de purificação dos anticorpos IgY foi o processo de deslipidização realizado de acordo com o método descrito por Akita, Nakai (1993). As gemas foram homogeneizadas com água destilada na proporção de 1:15. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa (30 minutos TA) e o pH foi ajustado para 5,5 com adição de tampão acetato de sódio 0,06 M. Em seguida, a mistura foi mantida a 4°C *overnight*, sob agitação. A solução foi centrifugada a 800g por 40 min a 4 °C. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante filtrado em papel filtro. O pH foi ajustado para 7,4 por meio da solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M).

Para a precipitação das proteínas de IgY, foi adicionado ao filtrado, sulfato de amônio 20% (Sigma Aldrich, EUA), na proporção de 20 g de sulfatorado 20g de sulfato de amônio. Após agitação de 45 min a 4°C, a solução foi centrifugada a 2.000 g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspêndido em PBS (1:10 do volume inicial).

Em seguida, ocorreu a etapa de purificação das proteínas de IgY, onde o filtrado foi lavado em sistema de ultrafiltração com membrana de 30 kDa (Amicon YM 30) com tampão fosfato de sódio 0,02M, K₂SO₄ 0,5 M, pH 7,5 e fracionado na coluna de afinidade HiTrap IgY Purification HP, 5mL (Amersham Biosciences, EUA) previamente equilibrada com ele. Com um fluxo de 3 mL/minuto os anticorpos foram eluídos utilizando gradiente linear de tampão fosfato de sódio 0,02 M no sistema completo de

cromatografia *Akta purifier* (Amersham Biosciences). As frações contendo os anticorpos IgY foram coletadas, quantificadas com absorbância em 280 nm (Biodrop, EUA), liofilizadas e mantidas à -20 °C.

Os dados do fracionamento dos anticorpos IgY foram analisados por meio das DO e plotados em gráfico para construção de um cromatograma.

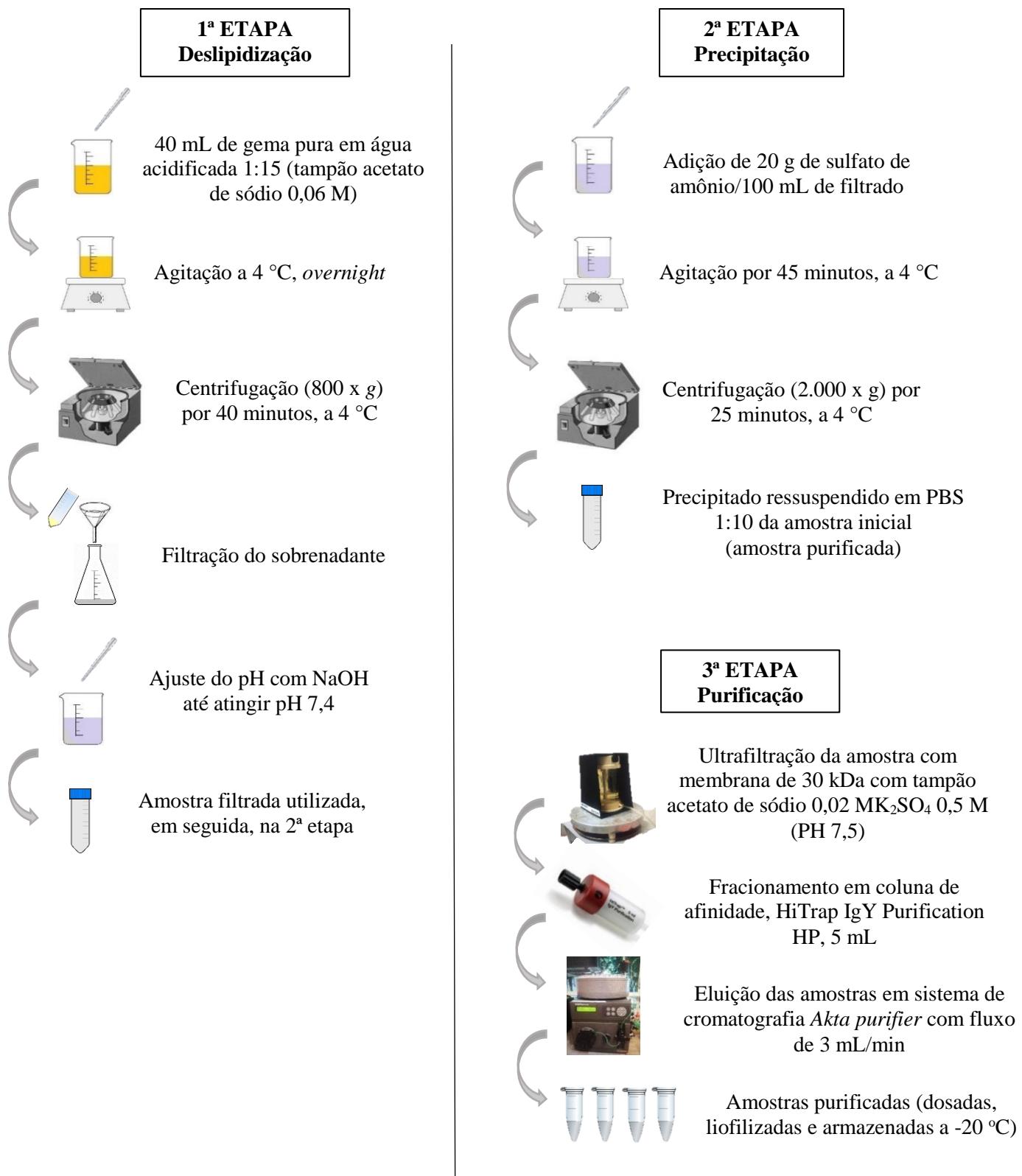


Figura 3. Esquema da purificação e fracionamento dos anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. 1^a etapa – Deslipidização das gemas; 2^a etapa - Precipitação dos anticorpos de IgY; e 3^a etapa - Purificação dos anticorpos IgY. Ao fim da 2^a etapa, era congelado um tubo Falcon com precipitado e os outros, eram utilizados logo em seguida. Após a 3^a etapa, obteve-se 15 mL de amostra purificadas que foram liofilizadas e distribuídas em alíquotas.

3.9 Cinética de detecção de anticorpos IgY por ELISA

O teste *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto foi utilizado para realizar a cinética de detecção da produção dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* no soro e na gema dos ovos das galinhas. As concentrações ótimas foram obtidas por titulação em bloco, para a obtenção do ensaio com maior razão sinal/ruído. Microplacas de poliestireno (Greiner Bio-One, EUA) foram sensibilizadas com 50 µl/poço com o extrato salino total de larvas de *A. ceylanicum* 10 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) *overnight* a 4 °C. As microplacas foram lavadas por três ciclos de cinco minutos cada com PBS Tween 20 a 0,05% com leite desnatado Molico 1% (PBS-TM). Em seguida, os sítios remanescentes para ligação de proteínas foram bloqueados com PBS-T 1% durante 30 minutos a 37 °C. Após três ciclos de cinco minutos de lavagem com PBS-T, foram diluídos 2 µg/mL de IgY purificada em PBS-TM 1% (50 µl/poço) e incubadas por 45 min a 37 °C. Como controle, foram utilizadas as amostras da pré-imunização e as dos animais controles negativos. Após o processo de lavagem com PBS-T, foi adicionado o conjugado anti-IgY (Sigma), marcado com peroxidase diluído 1:10.000 (50 µL/poço) em PBS-T 1%. A microplaca foi mantida por 45 minutos a 37 °C. Após outro ciclo de lavagem com PBS-T, a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co.) acrescido de H₂O₂ (Merck). A microplaca foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL de solução de ácido sulfúrico H₂SO₄ 2N (Synth, EUA).

Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm na leitora de ELISA (Tp Reader, Thermoplate, China). O *cut off* foi calculado pela soma das médias de densidade óptica (DO) das amostras pré-imunização e dos animais controles mais 2 vezes o desvio padrão, e o índice ELISA (IE) foi obtido a partir da DO obtida em cada diluição dividido pelo *cut-off*. As amostras foram consideradas positivas quando IE ≥ 1.

3.10 ELISA avidez para IgY anti-larva de *A. ceylanicum*

No ensaio ELISA avidez para anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* a reação foi semelhante ao ELISA indireto segundo Marcolino et al. (2000), com adaptações, conforme descrito anteriormente no item 3.9.

Após a etapa de incubação dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*, metade dos micropoços foi incubada com 50 μ L de uma solução de ureia 6M em PBS, pH 7,2 (U^+) e a outra metade com PBS, pH 7,2 (U^-), por 5 min à TA. Em seguida, as placas foram lavadas em cinco ciclos com PBS-T. A detecção da atividade residual foi realizada pela incubação dos anticorpos IgY com anticorpos IgG conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich, EUA), na diluição 1:10.000 (50 μ L/poço), por 60 minutos a 37 °C. As etapas de revelação e tempo de leitura de DO foram idênticas as descritas no item 3.9.

A avidez dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* foi calculada como índice de avidez (IA) para cada amostra, de acordo com Wiuff e colaboradores (2002). O cálculo foi realizado por meio da determinação da razão entre DO obtida nos micropoços tratados com ureia (U^+) e dos não tratados com ureia (U^-), sendo o resultado expresso na forma de porcentagem, conforme a fórmula: IA% = DO U^+ /DO U^- x 100. Foram considerados baixa avidez IA < 40% e alta avidez IA >60% (VILIBIC-CAVLEK et al., 2016).

3.11 ELISA para detecção de imunocomplexos em amostras soro humano

A detecção de imunocomplexos foi realizada em microplacas de baixa afinidade (Greiner Bio-One, EUA). As microplacas foram sensibilizadas com anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* em concentração de 40 μ g/mL a um volume final de 50 μ L/poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), por 18 horas a 4 °C, em câmara úmida. Depois de sensibilizadas as placas foram lavadas por três ciclos de cinco minutos cada com PBS-T, e em seguida, foram bloqueadas (200 μ L/poço) com PBS-TM 1%, por 45 minutos a 37 °C. Após o bloqueio, as microplacas foram lavadas, novamente conforme descrito. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas em PBS-T (1:80) conforme a padronização realizada e adicionadas 50 μ L/poço. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C, lavadas como descrito anteriormente, e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG humana conjugados com peroxidase (Sigma Aldrich, EUA) em diluição padronizada (1:2000) 50 μ L/poço. A placa foi mantida por 45 minutos a 37 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas, e em seguida, a reação foi revelada pela adição de OPD acrescido de H₂O₂ (Merck, EUA) preparado no momento do uso. Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 μ L de solução de H₂SO₄ 2N (Merck, EUA). Os valores foram determinados em filtro de 492 nm em leitora de ELISA (Tp Reader, Thermoplate, China). Os resultados

foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO\ amostra/cut\ off$. O *cut off* foi calculado para cada placa, pelas médias da DO dos controles negativos acrescidos de 3 desvios padrões. Considerando-se positivas as amostras com $IE \geq 1$.

3.12 Análise estatística

A análise estatística dos resultados dos testes ELISA foram realizadas através do programa computacional GraphPad Prism 6.0, EUA. As variáveis foram analisadas com testes específicos conforme a distribuição dos dados. Os dados do ELISA para a detecção de imunocomplexo foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's e testes de normalidade: D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Sminov. Nível de significância $P \leq 0,05$ (LEAL, SILVA, SOPELETE, 2005).

3.13 Normas de biossegurança

O procedimento de coleta e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foi realizado de acordo com as normas de biossegurança descritas por MINEO et al. (2005) e MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010).

4. RESULTADOS

4.1 Análise do perfil eletroforético (SDS-PAGE) do extrato salino de *A. ceylanicum*

Após a produção dos extratos salinos (ES) totais de larvas de *A. ceylanicum* na concentração de 5.000 µg/mL, foi realizado o SDS-PAGE 12%, corado por nitrato de prata para determinar o perfil eletroforético do extrato antigênico de *A. ceylanicum* (Figura 4). Bandas proteicas foram visualizadas em toda extensão do gel, com pesos moleculares aparentes variando de 130 a 7 kDa. Foram visíveis no perfil eletroforético do ES de *A. ceylanicum* bandas proteicas de 130, 94, 58, 47, 40, 31, 23, 18, 14, 10, 9 e 7 kDa.

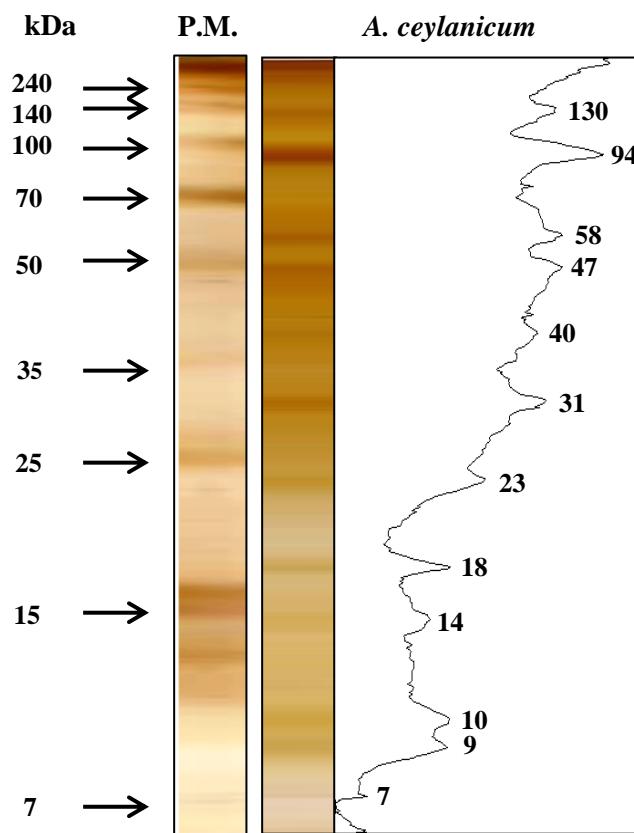


Figura 4. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% do extrato antigênico salino total de larvas filarioïdes (L3) de *Ancylostoma ceylanicum*, corado por nitrato de prata. PM – peso molecular em kilodaltons (kDa).

4.2 Coleta dos ovos das galinhas

O rendimento da quantidade de ovos foi de aproximadamente 5 – 7 ovos/ semana resultando em um volume total de gema/semana de aproximadamente 100 mL. Para a extração de anticorpos IgY anti-larva de *A. ceylanicum* foram utilizados 40 mL de gema e o restante foi armazenado a -20 °C.

4.3 Purificação dos anticorpos IgY

A primeira etapa de purificação dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* foi o processo de deslipidização das gemas que produziu, após a centrifugação, um sobrenadante translúcido (frações solúveis em água, S1) e um precipitado de cor amarela (fração purificada, P1), demonstrados na Figura 5A. Em seguida, com a adição de sulfato de sódio em S1 houve a precipitação dos anticorpos IgY. Após a centrifugação pôde-se observar um precipitado esbranquiçado (P2) e sobrenadante translúcido (S2), Figura 5B. Nesta etapa a fração S2 foi descartada e P2 ressuspensiondo em PBS.

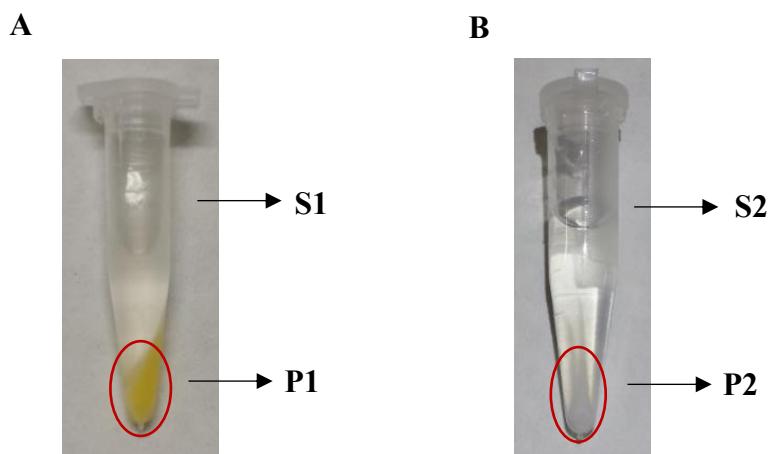


Figura 5. A. Processo de deslipidização das gemas mostrando as frações solúveis (S1) e purificadas (P1). B. Etapa de purificação das proteínas mostrando as frações S2 e P2. Utilizou-se sulfato de amônio 20% para a precipitação dos anticorpos IgY, enriquecidos em P2.

A cromatografia (*High performance liquid chromatography* – HPLC, AKTA Prime Plus) dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* foi realizada em coluna *HiTrap IgY Purification HP*, 5 mL dissolvidos em ácido trifluoacético 0,1%. O resultado visto no cromatograma utilizando a fração P2 demonstra a formação dos picos em 100 e 130 mL (Figura 6).

A dosagem proteica das amostras purificadas (Biodrop, EUA) de anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*, demonstrou concentrações entre 8.370 µg/mL e 4.000 µg/mL (Tabela 1)

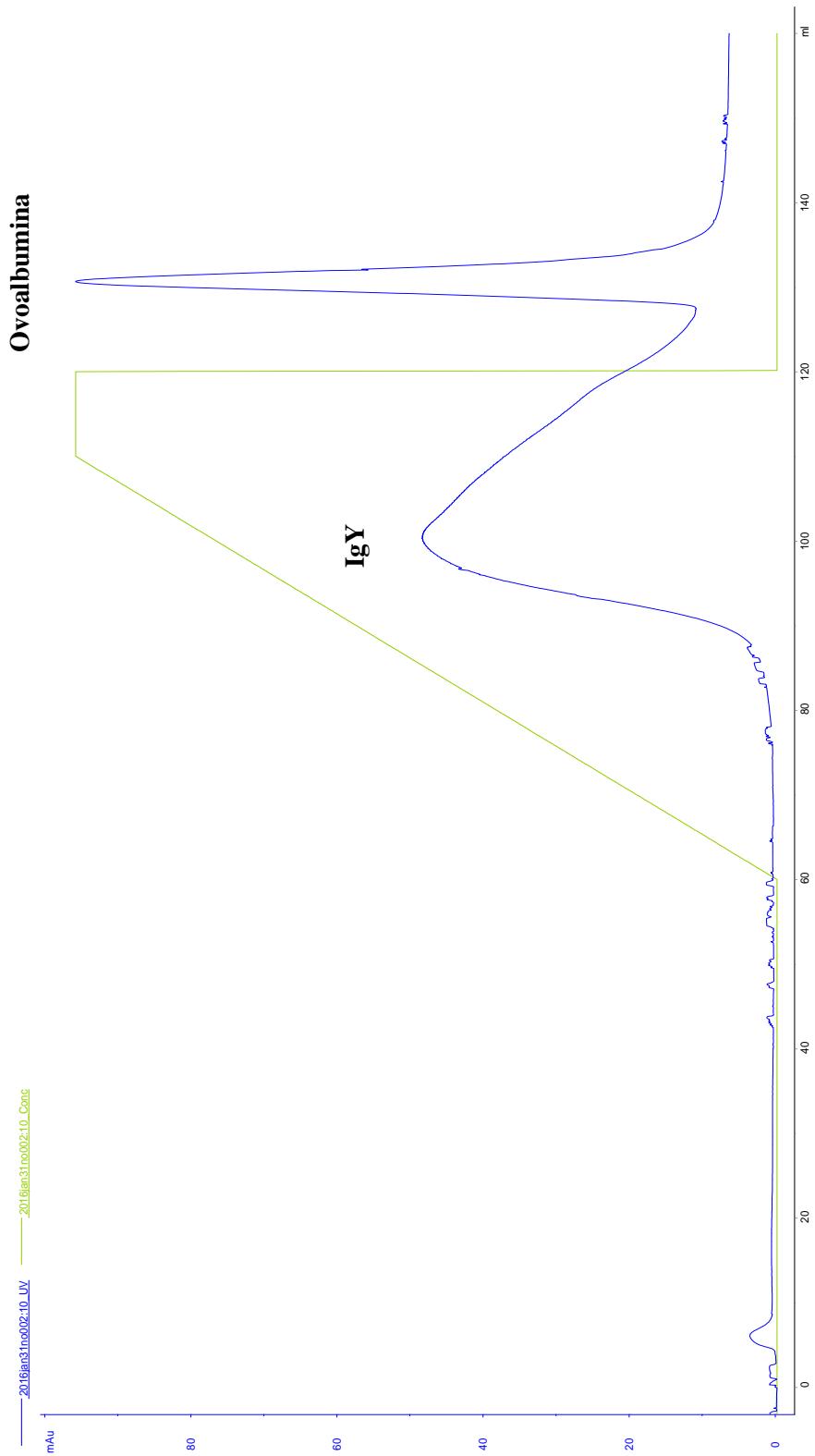


Figura 6. Cromatograma da purificação dos anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. O pico foi eluído com fluxo de 1mL/min. Linha azul – absorbância a 280 nm, onde observa-se o pico de IgY na fração 90 e o segundo pico sendo de ovoalbumina. Linha verde – concentração do tampão fosfato.

Tabela 1. Valores referentes a dosagem de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) das amostras de gemas de ovo purificadas (P2).

SEMANAS	CONCENTRAÇÃO PROTEICA ($\mu\text{g/mL}$)
Pré-imunização	4.490
*1^a Semana	5.900
2^a Semana	5.790
*3^a Semana	5.360
4^a Semana	6.000
*5^a Semana	4.550
6^a Semana	4.750
*7^a Semana	8.370
8^a Semana	4.000
*9^a Semana	4.300
10^a Semana	4.400
*11^a Semana	4.900
12^a Semana	5.800
*13^a Semana	4.700
14^a Semana	5.900
*15^a Semana	5.900
16^a Semana	5.700

* representam as imunizações

4.4 Perfil eletroforético das etapas de purificação dos anticorpos IgY

Para confirmar o processo de purificação dos anticorpos IgY foi realizada eletroforese em géis de poliacrilamida 8% (SDS-PAGE), como apresentado na Figura 7. Bandas proteicas foram visualizadas em toda extensão dos geis, com pesos moleculares aparentes variando de ≤ 200 a 20 kDa. A gema pura, apresentou bandas proteicas com peso aparente ≤ 200 , 110, 50, 80 e 20 kDa; as frações P1 e P2, e a amostra purificada no HPLC (fração 90) demonstraram bandas com pesos moleculares um pouco abaixo de 200 kDa. Houve também a marcação de outras bandas proteicas.

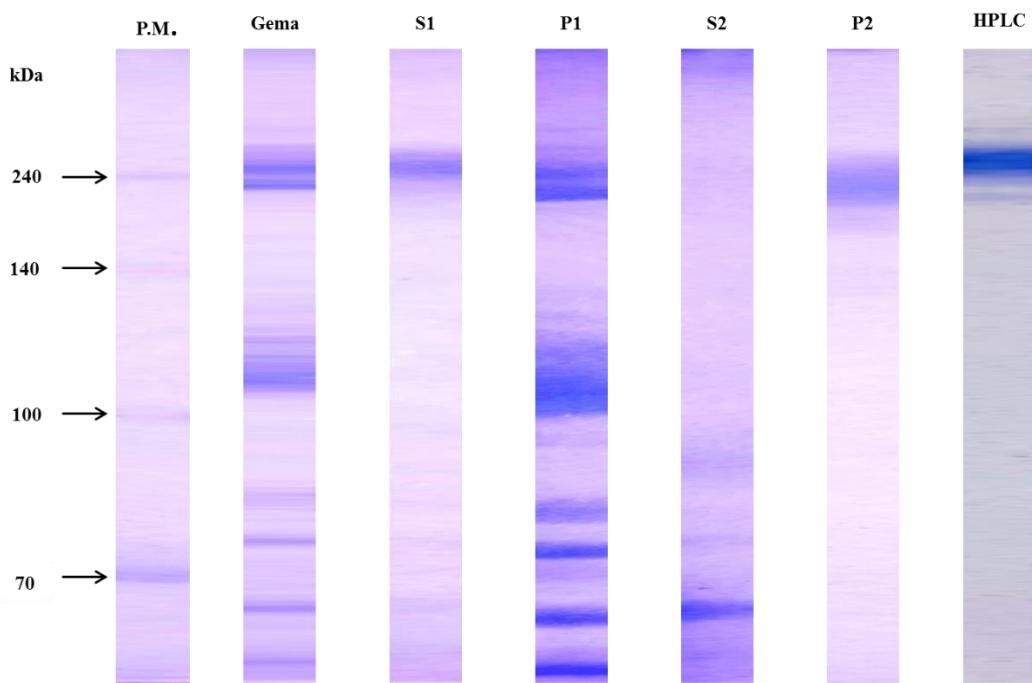


Figura 7. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8% dos anticorpos IgY purificados demonstrando bandas de IgY na gema, nas frações solúveis S1 (etapa de deslipidização), nas frações purificadas P1 (etapa de deslipidização) e P2 (etapa de purificação das proteínas), e na amostra purificada em HPLC. Não foram observadas bandas de IgY na fração S2.

4.5 ELISA de cinética para detecção de anticorpos IgY

O teste ELISA foi utilizado para realizar a cinética da produção dos anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*, tanto no soro quanto nas gemas purificadas. Nas primeiras semanas foi possível observar um baixo aumento no título de anticorpos, e nas semanas após as imunizações de reforço houve um aumento desse título. Os picos de produção de anticorpos específicos na gema ocorreram na 6^a, 8^a e 16^a semana após as imunizações (Figura 8).

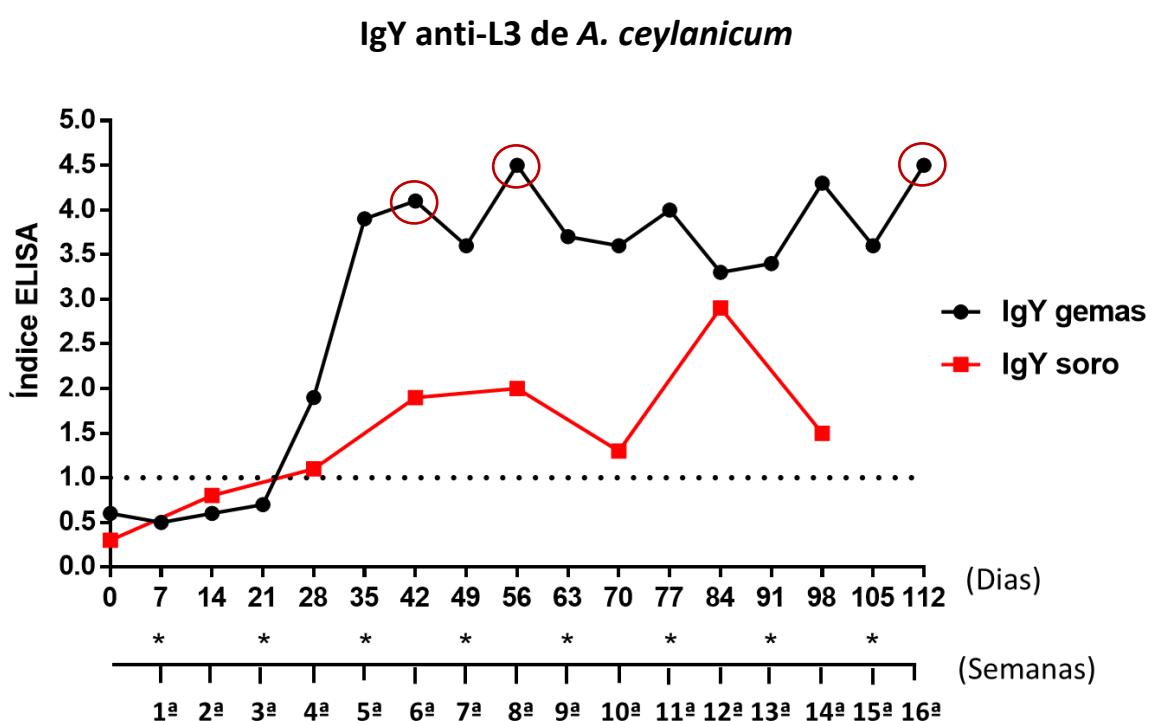


Figura 8. ELISA de cinética para detecção de anticorpos IgY no soro das galinhas e nas gemas realizado com as amostras semanais. Os círculos indicam os picos de maior produção dos anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. Na gema os picos foram na 6^a, 8^a e 16^a semana. * - representam as imunizações.

4.6 ELISA avidez

A análise da avidez dos anticorpos foi realizada com 10 amostras de soro de indivíduos positivos e negativos, cinco de cada grupo. Anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* com maior avidez foram detectados na 15^a semana com IA de 67%. O IA variou de 42% a 67%. Estes índices estão representados na Figura 9.

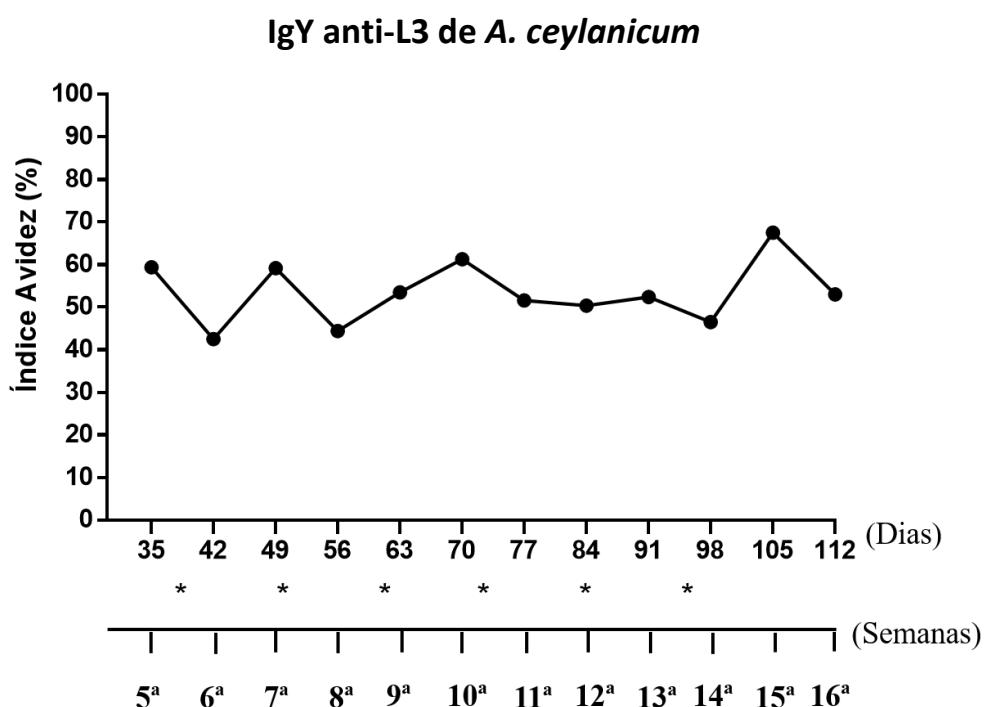


Figura 9. ELISA avidez dos anticorpos IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. A porcentagem foi estimada pelo cálculo de Índice Avidez (IA). O IA inicial foi de 60% na 5^a semana após a imunização, sofreu redução para 42% na 6^a semana e atingiu seu maior valor de IA (67%) na 15^a semana. IA>75% = alta avidez; IA<75% = baixa avidez). * - representam as imunizações.

4.7 ELISA para detecção de imunocomplexo

Os imunocomplexos foram detectados em 16,6% (5/30) das amostras de soro de indivíduos com ancilostomíase (grupo I), 10% (3/30) das amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo II), em 6,7% (2/30) das amostras de soro de indivíduos com outras parasitoses (grupo III) e 0% (0/30) das amostras de indivíduos negativos (grupo IV). Os resultados demonstraram a ocorrência de reatividade cruzada de IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* com antígeno de *S. stercoralis* e *Schistosoma mansoni*.

Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Não houve diferença estatística nos resultados.

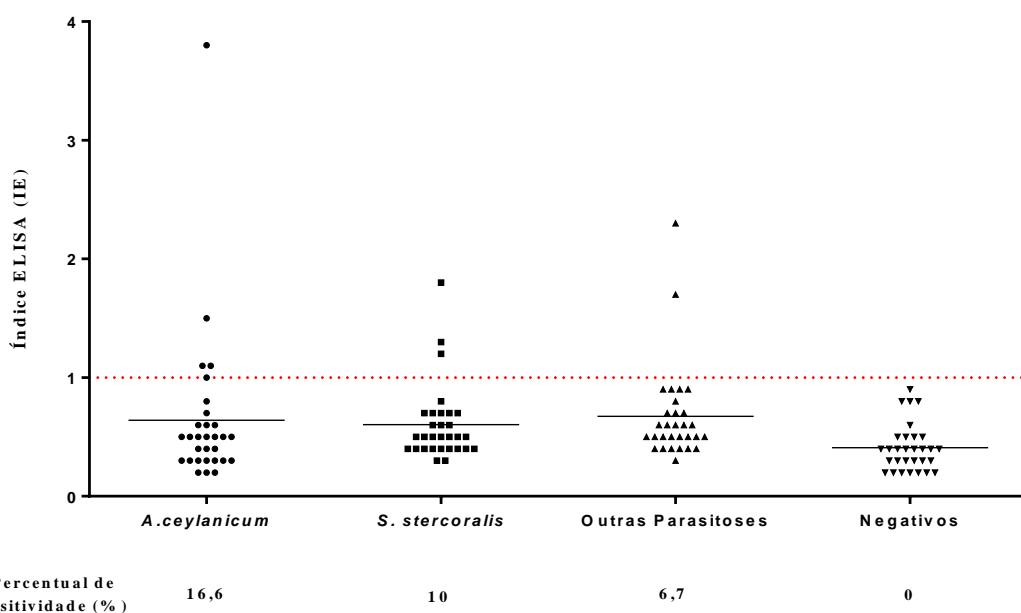


Figura 10. Detecção de imunocomplexo de IgY anti-larvas de *Ancylostoma ceylanicum* em amostras de pacientes com ancilostomíase (n=30), estrongiloidíase (n=30), outras parasitoses (n=30) e amostras negativas. A linha pontilhada indica o *cut off* do índice ELISA (IE = 1) e a linha contínua indica a média. A significância foi calculada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. (*P < 0,05).

5. DISCUSSÃO

A ancilostomíase é uma das parasitoses crônicas mais prevalentes no mundo (THOMPSON, 2015). Em determinados países a ancilostomíase é altamente endêmica e de risco zoonótico, tornando-se um grande problema de saúde pública (HOTEZ et al., 2008; McCLURE et al., 2014). *Ancylostoma ceylanicum* é uma espécie que produz infecções em humanos, e também tem sido utilizado como antígeno alternativo em experimentos laboratoriais (NGUI et al., 2014).

A sensibilidade do diagnóstico desta parasitose por técnicas microscópicas convencionais é baixa, e, são necessários técnicos de laboratório experientes para diferenciar larvas de ancilostomatídeos de larvas de *S. stercoralis* (CARROL, GROVE, 1986; BECKER et al., 2015). O teste sorológico é uma alternativa, no entanto, a reatividade cruzada com outros helmintos é uma limitação devido à complexidade antigênica e proximidade filogenética (FELICIANO et al., 2010; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013).

A proposta deste estudo foi realizar pela primeira vez a produção de anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* e aplicar no teste ELISA para detecção de imunocomplexos e na avaliação de reatividade cruzada com outros parasitos em amostras de soro de indivíduos com ancilostomíase, estrongiloidíase, outras parasitoses (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Taenia* sp., *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*) e amostras de soro negativas.

A tecnologia IgY é um método economicamente viável, de fácil reprodução e com alto grau de rentabilidade de anticorpos. Esta tecnologia é recomendada pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos em substituição a IgG de mamíferos. Também foi aprovada como recurso alternativo a favor do bem-estar animal pelo *Office Vétérinaire*, Suíça. Os anticorpos IgY podem ser usados para a produção de anticorpos a partir do momento em que as aves iniciam a postura (CHACANA et al., 2004; SCHADE et al., 2001). Um estudo utilizando a tecnologia IgY associada ao teste ELISA, como método diagnóstico para infecções por *Schistosoma japonicum*, mostrou-se sensível e específico (CAI et al., 2012).

Mesmo tendo diferenças estruturais, os anticorpos IgY tem função semelhante a IgG de mamíferos (METZGER, 1970). Uma galinha pode colocar cerca de 300 ovos por ano; 15 mL de gema de ovo consistem em 50-100 mg de IgY, ou seja, 2-10% de

anticorpos específicos. Após a primeira imunização as aves iniciam a produção de anticorpos e alguns dias depois eles podem ser encontrados na gema dos ovos (SCHADE, 2001; FERREIRA JÚNIOR et al., 2012). Durante as 16 semanas de coleta de ovos obteve-se uma média de 5-9 ovos por semana, o que resultava em um total de aproximadamente 100 mL de gema, desse volume total foram utilizados apenas 40 mL. Isso demonstra mais uma vez a rentabilidade da produção de anticorpos IgY. A vantagem mais relevante desta tecnologia é que evita a sangria, contribuindo para o bem-estar do animal (QURESHI, HEGGEN, HUSSAIN, 2000; CHACANA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013).

As imunizações das galinhas, neste estudo, foram realizadas com extrato total de L3 de *A. ceylanicum* (100 µl de antígeno), caracterizadas por eletroforese, demonstrando um perfil antigênico com polipeptídeos sem sinal de degradação eficaz para a produção de IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*. Uma imunização eficaz depende do intervalo de aplicações realizadas. Vários protocolos de imunizações recomendam inoculações de 2, e 3 semanas, ou uma vez por semana durante sete semanas consecutivas (TU, CHEN, CHANG, 2001). Outros autores fazem a imunização com intervalo de 10 dias (TINI et al., 2002; SILVA, TAMBOURGI, 2010). Essa etapa é importante devido à resposta imunológica, a qual deve ser dado tempo para se desenvolver. Devido a produção dos anticorpos ter ocorrido por mais de três meses foi necessário fazer oito imunizações com o antígeno total de *A. ceylanicum* para assegurar um alto título de anticorpos.

O isolamento da imunoglobulina a partir da gema pode ser realizado por técnicas de precipitação com sais, como: sulfato de sódio, ácido caprílico, dextransulfato, sulfato de amônio e polietilenoglicol (DEIGNAN et al., 2001), técnicas cromatográficas (CHACANA et al., 2004) e ultrafiltração (AKITA, NAKAI, 1993). Devido a rapidez e alta seletividade, a cromatografia é um dos métodos mais utilizados para a purificação de anticorpos. Conforme descrito em outros artigos, o fracionamento de anticorpos IgY tem sido realizado através de técnicas cromatográficas confirmado a eficácia do anticorpo produzido (TU, CHEN, CHANG, 2001; FERREIRA JÚNIOR et al., 2012; JIANG, DIRAVIYAM, ZHANG, 2016). Neste estudo, as amostras de IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* foram purificadas por cromatografia, adequadamente conforme dados de caracterização eletroforética de reatividade anti-antígeno de *A. ceylanicum*. Mais estudos são necessários para o aprimoramento e uso da técnica. Sendo assim, os anticorpos produzidos podem ser considerados possíveis ferramentas de imunodiagnóstico.

Em 1893, Klemperer descreveu um experimento no qual demonstrou que, a imunização de galinhas resulta na transferência de anticorpos específicos para a gema do

ovo. A atividade de transferência dos anticorpos IgY do soro para a gema induz o acúmulo de altas concentrações de anticorpo e algumas propriedades da IgY permitem a sua utilização em diversas reações (FERREIRA JÚNIOR et al., 2012; LI et al., 2015). A cinética de detecção permitiu determinar as melhores concentrações de anticorpos IgY específicos, por meio de índice ELISA, para serem utilizados posteriormente. Conforme os resultados apresentados, as melhores concentrações foram detectadas a partir da 6^a semana após imunização e continuou até a 16^a semana. Sendo que, nas 6^a, 8^a e 16^a semanas ocorreram os picos de melhores concentrações dos anticorpos.

A avidez dos anticorpos aumenta gradualmente após a exposição a um imunógeno (MARINO et al., 2011). A produção, caracterização e aplicações dos anticorpos IgY contra *Toxoplasma gondii* foram descritos por Ferreira-Junior et al. (2012). Os autores referiam-se à alta especificidade e avidez dos anticorpos produzidos e demonstraram a capacidade da imunoglobulina Y em detectar formas de *T. gondii*. Como próximo passo propomos a caracterização da IgY produzida por meio da marcação em ovos/larvas de *Ancylostoma*, *Strongyloides* e outros parasitos. Os resultados da avidez demonstrados no presente estudo resultaram em IA de 67% (alta avidez). Mesmo assim, o anticorpo IgY anti-larva de *A. ceylanicum* não foi viável para utilização nos testes utilizados. Os resultados obtidos na detecção de imunocomplexo demonstraram que há reatividade cruzada entre *A. ceylanicum* e outros parasitos. Isto pode acontecer em decorrência da exposição de indivíduos que poderiam ter tido um contato prévio com os parasitos (GONZAGA et al., 2011). A partir desse resultado, fica claro que a reatividade cruzada é um obstáculo no diagnóstico sorológico da ancilostomíase, e com base neste estudo outros trabalhos podem ser desenvolvidos utilizando diferentes técnicas, como, *phage display* e engenharia genética.

6. CONCLUSÃO

A resposta imunológica foi demonstrada, em galinhas, contra proteínas antigênicas do extrato salino total de larvas de *A. ceylanicum* e posteriormente produzido e fracionado com êxito os anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum*.

Os anticorpos IgY anti-larvas de *A. ceylanicum* não demonstraram, no presente estudo, ter aplicabilidade no imunodiagnóstico da ancilostomíase humana e na detecção de reatividade cruzada com *S. stercoralis* e outros helmintos, como *Schistosoma mansoni*. No entanto, a caracterização dessa IgY por outras técnicas, tais como: seleção/purificação contra抗ígenos de outros parasitos, imunohistoquímica em estágios de helmintos, padronização na detecção de coproantígenos, poderão aumentar a sensibilidade e especificidade em outros protocolos. Destacou-se a não detecção de imunocomplexo em amostras de soros de indivíduos negativos.

REFERÊNCIAS

- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 2, p. 207-214, 1993.
- ANAMNART, W.; PATTANAWONGSA, A.; INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W. Factors affecting recovery of *Strongyloides stercoralis* larvae: an approach to a newly modified formalin-ether concentration technique for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 97-100, 2010.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford: C.A.B. International, 2nd ed., p. 650, 2000.
- ARAKAKI, T.; HASEGAWA, H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Japanese Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 1, p. 11-17, 1988.
- ARAUJO, E. S.; PEREIRA, C. A. J.; PEREIRA, A. T. M.; MOREIRA, J. M. P.; REZENDE, M. C.; RODRIGUES, J. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. The role of IL-33/ST2, IL-4, and eosinophils on the airway hyperresponsiveness induced by *Strongyloides venezuelensis* in BALB/c mice. **Parasitology Research**, v. 143, p. 1-11, 2016.
- ASFHORD, R. W.; BARNISH, G. B. *Strongyloides fuelleborni* and similar parasites in animals and man. In: GROVE, D. I., editor. **Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man**. London: Taylor & Francis, p. 271-286, 1989.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Metrods zur Auffindung von *Ankylostomum* (Nematoden) – Larven in erdproben. Mededeel mit. H. Geneesk Batavia: **Laboratories Weltevreden, Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BARCANTE, J. M. P. Helmintologia. In: NEVES, D. P.; GOMES, C. F. L.; IGLESIAS, J. J. F.; SANTOS, R. L. **Parasitologia Dinâmica**, 3ed., São Paulo: Atheneu, p. 362-372, 2009.
- BARCANTE, J. M. P.; BARCANTE, T. A.; DIAS, S. R.; VIEIRA, L. Q.; LIMA, W. S.; NEGRAO-CORREA, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitology Research**, v. 89, p. 89-93, 2003.
- BECKER, S. L.; PIRAI SOODY, N.; KRAMME, S.; MARTI, H.; SILUÉ, K. D.; PANNING, M.; NICKEL, B.; KERN, W. V.; HERRMANN, M.; HATZ, C. F.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; VON MÜLLE, J. Real-time PCR for detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Côte d'Ivoire: diagnostic accuracy, inter-laboratory comparison and patterns of hookworm co-infection. **Acta Tropica**, v. 150, p. 210–217, 2015.

BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S. M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **The Lancet Global Health**, v. 367, p. 1521-1532, 2006.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, A.; ANGHEBEN, A.; BOSCOLO, M.; ANSELMI, M.; MAROCCO, S.; MONTEIRO, G.; GOBBO, M.; BISOFFI, G.; GOBBI, F. Randomized clinical trial on ivermectin versus thiabendazole for the treatment of strongyloidiasis. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-6, 2011.

BLAXTER, M.L. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 347-355, 2000.

BRELOER, M.; ABRAHAM, D. *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. **Parasitology**, v. 143, p. 1-21, 2016.

BROOKER, S.; BETHONY, J.; HOTEZ, P. J. Human hookworm infection in the 21st century. **Advanced Parasitology**, v. 58, p. 197-288, 2004.

BRUNET, J.; LEMOINE, J. P.; LEFEBVRE, N.; DENIS, J.; PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; TRAUB, R. J.; PESSON, B.; CANDOLFI, E. Bloody diarrhea associated with hookworm infection in traveler returning to France from Myanmar. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 1878-1879, 2015.

BUNGIRO, JR. R. D.; SUN, T.; HARRISON, L. M.; SHOEMAKER, C. B.; CAPELLO, M. Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 293-303, 2008.

BUNGIRO, JR. R. D.; CAPELLO, M. Twenty-first century progress toward the global control of human hookwoorm infection. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, p. 210-127, 2011.

BUONFRATE, D.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; ANGHEBEN, A.; MUÑOZ, J.; GOBBI, F.; van den ENDE, J.; BISOFFI, Z. Severe strongyloidiasis: A systematic review of case reports. **BioMed Central Infected Diseases**, v. 13, p. 1-10, 2013.

BUONFRATE, D.; GOBBI, F. Treatment for chronic *Strongyloides stercoralis* infection: moderate-to-low evidence shows that ivermectin is more effective and tolerable than albendazole and thiabendazole, respectively. **Evidence-Based Medicine**, v. 21, p. 101-102, 2016.

CAI, Y-C; GUO, J.; CHEN, S-H; TIAN, L-G; STEINMANN, P.; CHEN, M-X; LI, H.; AI, L.; CHEN, J-X. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, p. 385-390, 2012.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P. E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunology Research**, v. 21, p. 1-6, 2000.

CARROLL, S. M.; GROVE, D. I. Experimental infection of human with *Ancylostoma ceylanicum*: clinical, parasitological, haematological and immunological findings. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 38, p. 38–45, 1986.

CHACANA, P.A.; TERZOLO, H.R.; GUTIÉRREZ, C.E.; SCHADE R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 85, p. 179-189, 2004.

CHAMI, G. F.; FENWICK, A.; BULTE, E.; KONTOLEON, A. A.; KABATEREINE, N. B.; TUKAHEBWA, E. M.; DUNNE, D. W. Influence of *Schistosoma mansoni* and hookworm infection intensities on anaemia in Uganda villages. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-18, 2015.

CHALGHOUMI, R.; BECKERS, Y.; PORTETELLE, D.; THÉWIS, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 2, p. 295-308, 2009.

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

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

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS, D. M.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of cropoculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 313-317, 1997.

COVA, L. DNA-designed avian IgY antibodies: novel tools for research, diagnostics and therapy. **Journal of Clinical Virology**, v. 34, p. 70-74, 2005.

DAVALOS-PANTOJA, L.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, D.; HIDALGO-ALVAREZ, R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 11, p. 657-673, 2000.

DAVEY, D.; MANICKMAM, N.; SIMMS, B. T.; HARRISON, L. M.; VERMEIRE, J. J.; CAPPELLO, M. Frequency and intensity of exposure mediate resistance to experimental infection with the hookworm, *Ancylostoma ceylanicum*. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 243–249, 2013.

DEIGNAN, I. A.; ALWAN, L. M.; KELLY, J.; O'FARRELLY, C. Hen egg yolk prevents bacterial adherences: a novel function for a familiar food. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 158-161, 2001.

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

ELLIOT, D. E.; SUMMERS, R. W.; WEINSTOCK, J. V. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p.457-464, 2007.

ERHARD, M. H.; SCHMIDT, P.; ZINSMEISTER, P.; HOFMANN, A.; MÜNSTER, U.; KASPERS, B.; WIESMÜLLER, K. H.; BESSLER, W. G.; STANGASSINGER, M. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poultry Science**, v. 79, p. 1264-1270, 2000.

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J. L.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treat patients: case series and literature review. **Journal of Infection**, v. 54, p.18-27, 2007.

FAIRFAX, K. C.; HARRISON, L. M.; CAPPELLO, M. Molecular cloning and characterization of nematode polyprotein antigen/allergen from the human and animal hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 196, p. 37-44, 2014.

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 153-161, 2010.

FELICIANO, N. D; RIBEIRO, V. S.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; GONZAGA, H. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e2792, 2014.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIO, G. da S.; MARCUSSO, P. F.; LOUREIRO, B. A. Biologia do sistema immune de aves: revisão. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, p. 131-140, 2013.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSINI, I.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; NUNES-ARAÚJO, F. F. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency vírus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.

FERREIRA-JÚNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; JÚNIOR, A. G. M.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; FILHO, H. H. S.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. P. Production, characterization, and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **Plos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

FLORES, D.; PANIC, G.; BRAISSANT, O.; KEISER, J. A novel isothermal microcalorimetry tool to assess drug effects on *Ancylostoma ceylanicum* and *Necator americanus*. **Applied Microbial Cell Physiology**, v. 100, p. 1-10, 2015.

FRANCIS, L.; KIRUNDA, B. E.; ORACH, C. G. Intestinal helminth infections and nutritional status of children attending primary schools in Wakiso District, Central Uganda. **International Journal Environment Research Public Health**, v. 9, p. 2910-2921, 2012.

FRIEDMAN, R. D. Comparation of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 346-349, 1982.

FUJIWARA, R. T.; GEIGER, S. M.; BETHONY, J.; MENDEZ, S. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 285-293, 2006.

GADDE, U.; RATHINAM, T.; LILLEHOJ, H. S. Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases--A review. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, p. 136-176, 2015.

GEIGER, S. M.; MASSARA, C. L.; BETHONY, J.; SOBOSLAY, P. T.; CORREA-OLIVEIRA, R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 136, p. 334-340, 2004.

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; MANHANI, M. N.; SILVA, D. A.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. **Immunology Letters**, v. 139, p. 87-92, 2011.

GONZAGA, H. T.; VILA-VERDE, C.; NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR; COSTA-CRUZ, J. M. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2013.

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

HARADA, U.; MORI, O. A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medica**, v. 1, p. 177-179, 1955.

HAAS, J. D.; BROWNIE, T. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 676-690, 2001.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*, Puerto Rico. **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M.; BOTTAZZI, M. E.; BROOKER, S. Hookworm: "The great infection of mankind". **PLoS Medicine**, v. 2, p. 187-191, 2005.

HOTEZ, P. J.; BRINDLEY, P. J., BETHONY, J.M.; KING, C. H.; PEARCE, E. J., JACOBSON, J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1311–1321, 2008.

HU, W.; YU., X.G.; WU, S.; TAN, L. P.; SONG, M. R.; ABDULAH, A. Y.; WANG, Z.; JIANG, B.; LI, G. Q. Levels of *Ancylostoma* infections and phylogenetic analysis of cox 1 gene of *A. ceylanicum* in stray cat faecal samples from Guangzhou, China. **Journal of Helminthology**, v. 30, p. 1-6, 2015a.

HU, W.; YU., X.G.; WU, S.; TAN, L. P.; SONG, M. R.; ABDULAH, A. Y.; WANG, Z.; JIANG, B.; LI, G. A multiplex PCR for simultaneous detection of three zoonotic parasites *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum*, and *Giardia lamblia* assemblage A. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015b.

JIANG, X.; DIRAVIYAM, T.; ZHANG, X. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) using a human mycoplasma protein. **Journal of Chromatography B**, v. 1012-1013, p. 37-41, 2016.

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

KATO, K.; MIURA, M. Comparasitive wxmintions. **Japanese Journal Parasitology**, v. 3, p. 35, 1954.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 23, p. 1937-1948, 2008.

KEISER, J.; PANIC, G.; ADELFI, R.; COWAN, N.; VARGAS, M.; SCANDALE, I. Evaluation of an FDA approved library against laboratory models os human intestinal nematode infection. **Parasites & Vectors**, v. 376, p. 1-10, 2016.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J. M.; DELANEY, K. H.; KLEMENT, G.; WEITZ J. I. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. **Laboratory Animal Science**, v. 46, p. 286-90, 1996.

KLEMPERER, F. Ueber naturliche immunitat und ihre Verwethung fur die immunisirungstherapie. **Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 31, p. 356-384, 1893.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assemblage of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEAL, G. D.; SILVA, D. A. de S.; SOPELETE, M. C. Conceitos básicos de bioestatística. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, p. 175-177, 2005.

LEE, K. A.; CHANG, S. K.; LEE, Y. J.; LEE, J. H.; KOO, N. S. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 488-493, 2002.

LEITE, A. C. R. Ancylostomatidae. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 12ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

LESLIE, G.A.; CLEM, L.W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 130, p. 1337-1352, 1969.

LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p. 33-43, 2014.

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

LÉVESQUE, S.; MARTINEZ, G.; FAIRBROTHER, J. M. Improvement of adjuvante systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poultry Science Association**, v. 86, p. 630-635, 2007.

LI, X.; NAKANO, T.; SUNWOO, H. H.; PAEK, B. H.; CHAE, H. S.; SIM, J.S. effects of egg and yolk weights on yolk antibody (igy) production in laying chickens. **Poultry Science Association**, v. 77, p. 266-270, 1998.

LI, X.; WANG, L.; ZHEN, Y.; LI, S.; XU, Y. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine produvtion: a review. **Journal of Animal Science an Biotchnology**, v. 6, p. 1-10, 2015.

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 37, p. 655-682, 1993.

LOWRY, O. H.; ROUSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p. 265-275, 1951.

LOUKAS, A.; PROVIC, P. Immune responses in hookworm infections. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p. 689-703, 2001.

LOUKAS, A.; CONSTANT, L.S.; BETHONY, J.M. Immunobiology of hookworm infection. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, p. 115-124, 2006.

MACHADO, E. R.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 7-14, 2008.

MARCOLINO, P. T.; SILVA, D. A. O.; LESER, P.G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R. Molecular markers in acute and chronic phases de human Toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by western blotting. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 384-389, 2000.

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

MARCQ, C.; MARLIER, D.; BECKERS, Y. Improving adjuvant systems for polyclonal egg yolk antibody (IgY) production in laying hens in terms of productivity and animal welfare. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 165, p. 54-63, 2015.

MARINO, G. L.; BOJANICH, M. V.; LOPEZ, M. A.; ALONSO, J.M. Prueba de avidez de los anticuerpos IgG en la infección por *Toxocara canis*. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 45, p. 323-327, 2011.

McCLURE, E. M.; MESHNICK, S. R.; MUNGAI, P.; MALHOTRA, I.; KING, C. L.; GOLDENBERG, R. L.; HUDGENS, M. G.; SIEGA-RIZ, A. M.; DENT, A. E. The association of parasitic infections in pregnancy and maternal and fetal anemia: a cohort study in coastal Kenya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. 1-8, 2014.

MEERA, G. N.; De'BROSKI, R. H. Immune polarization by hookworms: taking cues from TH2, ILC2 and M2. **Immunology**, v. 148, p. 115-124, 2016.

METZGER, H. Structure and function of gamma M macroglobulins. **Advances in Immunology**, v. 12, p. 57-116, 1970.

MILLER, M. A.; CHURCH, L. W.; SALGADO, C. D. *Strongyloides* hyperinfection: a treament dilemma. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 336, p. 358-361, 2008.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, p. 81-111, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Biossegurança em saúde: prioridades e estratégias de ação. **Organização Pan-Americana de Saúde**, Brasília, 2010.

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

MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; FERREIRA JUNIOR, A.; SOPELETE, M. C.; ABDALLAH, V. O. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 109, p. 103-107, 2009.

MULLER, R. Worms and human disease. **London School of Hygiene and Tropical Medicine**, v. 2, p. 115-120, 2001.

NAVES, M. M.; COSTA-CRUZ, J. M. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection among the elderly in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 309-313, 2013.

NGUI, R.; LIM, Y. A. L.; TRAUB, R.; MAHMUD, R.; MISTAM, M. S. Epidemiological and genetic data supporting the transmission of *Ancylostoma ceylanicum* among human and domestic animals. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-7, 2012.

NGUI, R.; LIM, Y. A. L.; ISMAIL, W. H. W.; LIM, K. N.; MAHMUD, R. Case Report: zoonotic *Ancylostoma ceylanicum* infection detected by endoscopy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 86-88, 2014.

NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**, v. 143, p. 1-11, 2016.

OSAZUWA, F.; AYO, O. M.; IMADE, P. A significant association between intestinal helminth infection and anemia burden in children in rural communities of Edo state, Nigeria. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 30-34, 2011.

PAGE, W.; SPEARE, R. Chronic strongyloidiasis - Don't look and you won't find. **Australian Family Physician**, v., 45, p., 40-44, 2016.

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

PEARSON, R. D. An update on the geohelminths: *Ascaris lumbricoides*, hookworms, *Trichuris trichiura*, and *Strongyloides stercoralis*. **Current Infectious Disease Reports**, v. 4, p. 59–64, 2002.

POLANCO, L. C.; GUTIÉRREZ, L. A.; ARIAS, J. C. Infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). **Revista Española de Salud Pública**, v. 88, p. 581-600, 2013.

PRIETO-PÉREZ, P.; PÉREZ-TANOIRA, R.; CABELLO-ÚBEDA, A.; PETKOVA-SAIZ, E.; GÓRGOLAS-HERNÁNDEZ-MORA, M. Geoelmintos. **Enfermedades Infecciosas e Microbiología Clínica**, v. 34, p. 1-6, 2016.

QUINNELL, R. J.; PRITCHARD, D. I.; RAIKO, A.; BROWN, A. P.; SHAW, M. A. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. **The Journal Infectious Diseases**, v. 190, p. 430-438, 2004.

QURESHI, M.A.; HEGGEN, C.L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 103-119, 2000.

RASCOE, L. N.; PRICE, C.; SHIN, S. H.; McAULIFFE, I.; PRIEST, J. W.; HANDALI, S. Development of Ss-NIE-1 recombinant antigen based assays for immunodiagnosis of Strongyloidiasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1-10, 2015.

REPETTO, A. S.; RUYBAL, P.; SOLANA, M. E.; LÓPEZ, C.; BERIMI, C. A.; SODO, C. D. A.; CAPPA, S. M. G. Comparasion between PCR and larva visualization methods for diagnostic of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: a proposed algorithm. **Acta Tropica**, v. 157, p.169-177, 2016.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; CHIODINI, P.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; GOTUZZO, E.; MUÑOZ, J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, p.1-10, 2013.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3ed., p. 250-261, 2010.

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

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for rotine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Departament**, v. 8, p. 326-334, 1948.

ROBERTS, D. J. Hematologic changes associated with specific infections in the tropics. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 30, p. 395–415, 2016.

RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4 and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v.101, p.1209-1214, 2007.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; TEXEIRA, A. L.; BARROS-MAZON, S.; TREVISAN, R. C. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrongiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 83-87, 1993.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRIZOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes, modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 8, p. 5-8, 1954.

SANDOVAL, L.; MERCADO, R.; APT, W.; NAVARRET, C.; CONTRERAS-LEVICOY, J.; UETA, M. T.; JERCI, M. I.; CASTILLO, D. Strongyloidiasis no autóctona em Chile: descripción de um brote familiar. **Parasitología Latinoamericana**, v. 59, p. 76-78, 2004.

SCHADE, R. Chicken egg yolk antibodies. Production and application: IgY Technology. **Springer Science & Business**, v. 33, p. 129-134, 2001.

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgYtechnology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative Laboratory Animals**, v. 33, p. 129-154, 2005.

SCHÄR, F.; ODERMATT, P.; KHIEU, V.; PANNING, M.; DUONG, S.; MUTH, S.; MARTI, H.; KRAMME, S. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. **Acta Tropica**, v. 126, p. 89-92, 2013.

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chickens egg yolk antibodies, production and applications – IgY-Technology**. Springer-Verlag: Berlin, p. 255, 2001.

SARINHO, S. C. E.; OLIVEIRA, P.; MIRANDA, T.; BRANDÃO, E.; ROCHA, A. C.; BONFIM, C.; MEDEIROS, Z.; AGUIAR-SANTOS, A. M. Epidemiological assessment of neglected diseases in children: lymphatic filariasis and soil-transmitted helminthiasis. **Jornal de Pediatria**, v. 89, p. 250-255, 2012.

SATO, M.; SANGUANKIAT, S.; YOONUAN, T.; PONGVONGSA, T.; KEOMOUNGK-HOUN, M.; PHIMMAYOI, I.; BOUPA, B.; MOJI, K.; WAIKAGUL, J. Copro-molecular identification of infections with hookwoorms eggs in rural Lao PDR. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 104, p. 617-622, 2010.

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

SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S.; PASSOS-LIMA, A. B.; ESPINDOLA, F. S.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 687-691, 2003.

SILVA, W. D; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010.

STOCKWIN, L.H.; HOLMES, S. Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance! **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 7, p. 1133-1152, 2003.

SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 174-184, 2006.

SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies vírus. **Rapid Communication of Mass Spectrometric**, v. 15, p. 708-712, 2001.

SVENDSEN, L.; CROWLEY, A.; OSTERGAARD, L.H.; STODULSKI, G.; HAU, J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Journal of American Association for Laboratory Animal Science**, v. 45, p. 89-93, 1995.

THOMPSON, R. C. A. Neglected zoonotic helminths: *Hymenolepis nana*, *Echinococcus canadensis* and *Ancylostoma ceylanicum*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. 426-432, 2015.

THOMPSON, F.J.; MITREVA, M.; BARKER, G.L.; MARTIN, J.; WATERSON, R.H.; McCARTER, J.P.; VINEY, M.E. An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 142, p. 32-45, 2005.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comparative biochemistry and physiology. **Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, p. 569-574, 2002.

TRAUB, R. J. *Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 1009-1015, 2013.

TRAUB, R. J.; INPANKAEW, T.; SUTTHIKORNCHAI, C.; SUKTHANA, Y.; THOMPSON, R. C. PCR-based coprodiagnostic tools reveal as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 67-73, 2008.

TREGER, R. S.; OTCHERE, J.; KEIL, M. F.; QUAGRAINE, J. E.; RAI, G.; MOTT, B. T.; HUMPHRIES, D. L.; WILSON, M.; CAPELLOS, M.; VERMEIRE, J. J. Short report: in vitro screening of compounds against laboratory and field isolates of human hookworm reveals quantitative differences in anthelmintic susceptibility. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 71-74, 2014.

TU, Y. Y.; CHEN, C. C.; CHANG, H. M. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrine by immunoaffinity chromatography. **Food Research International**, v. 34, p. 783-789, 2001.

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

VAN DOORN, H. R.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTAYN, J. C.; WISMANS, P. J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; VAN GOOL, T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 438-442, 2007.

VELOSO, M. G.; PORTO, A. S.; MORAES, M. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: autopsy case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 413-415, 2008.

VILIBIC-CAVLEK, T.; BARBIC, L.; STEVANOVIC, V.; PETROVIC, G.; MLINARIC-GALINOVIC, G. IgG avidity: an important serologic marker for the diagnosis of tick-borne encephalitis virus infection. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, p. 119–121, 2016.

VINEY, M. E. The biology and genomics of *Strongyloides*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 195, p. 49–54, 2006.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. In: HODGKIN, J.; ANDERSON, P. **Wormbook**, ed. The *C. elegans*. Research Community, p. 1-17, 2015.

WANKE, R.; SCHMIDT, P.; ERHARD, M. H.; SPRICK-SANJOSE, M. A.; STANGASSINGER, M.; SCHMAHL, W.; HERMANNS, W. Freund's complete adjuvant in the chicken: efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction. **Journal Zentralbl Veterinarmed A**, v.43, p. 243-253, 1996.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, p.392-398, 1995.

WHO. Hookworm disease: disease burden. In: Research, I.F.V., (Ed.), Parasitic diseases, prevalence stats for hookworm worldwide, 2012.

WIJERS, D. J.; SMIT, A. M. Early symptoms after experimental infection of man with *Ancylostoma braziliense* var. *ceylanicum*. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 18, p. 48–52,1966.

WIUFF, C.; THORBERG, B. M.; ENGVALL, A.; LIND, P. Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in a Salmonella non-endemic region. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 69-82, 2002.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal Australia**, v. 29, p. 375-376, 1921.

WISNIEWSKI, M.; JAROS, S.; BASKA, P.; CAPPELLO, M. C.; DLUGOSZ, E.; WEDRYCHOWICZ, H. Hamsters vaccinated with Ace-mep-7 DNA vaccine produced protective immunity against *Ancylostoma ceylanicum* infection. **Experimental Parasitology**, v. 163, p. 1-7, 2016.

ZAHA, O.; HIRATA, T.; KINJO, F.; SAITO, A. Strongyloidiasis - progress in diagnosis and treatment. **First Departament of Internal Medicine**, v. 39, p. 695-700, 2000.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 364-371, 2003.