

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Antígenos de excreção/secreção de *Strongyloides venezuelensis*
aplicados ao diagnóstico da strongiloidíase humana**

Renata Araújo Cunha

Uberlândia/MG

2017

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Antígenos de excreção/secreção de *Strongyloides venezuelensis*
aplicados ao diagnóstico da strongiloidíase humana**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
requisito parcial a obtenção do título de
Mestre.

Mestranda: Renata Araújo Cunha

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Costa
Cruz

Uberlândia/MG

2017

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

C972a Cunha, Renata Araújo, 1990
2017 Antígenos de excreção/secreção de *Strongyloides venezuelensis*
aplicados ao diagnóstico da estrogiloidíase humana / Renata Araújo
Cunha. - 2017.
51 f. : 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. Estrogiloidíase - Teses. 3. *Strongyloides venezuelensis* - Teses. 4. Imunodiagnóstico - Teses. I. Costa-Cruz, Julia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a Deus, autor de meu destino e meu guia.

À minha mãe Rosemeire Martins de Araújo Cunha, ao meu pai Luciano Rodrigues da Cunha e ao meu irmão Gustavo Araújo Cunha pelo amor e carinho a todo momento, principalmente pelos momentos de ausência enquanto estive trabalhando. Se cheguei até aqui, foi por vocês!

Aos meus avós Valdir, Maria de Lourdes e Francisco de Assis que não medem esforços para me ver feliz. E ao meu avô Tubertino que, ao lado de Deus, sempre se fez presente em meu coração, não posso tocá-lo mas posso sentir seu infinito amor.

À minha madrinha, Rosângela, por ser exemplo de mãe, mulher e profissional, que me mostrou o caminho em direção à Ciência.

Ao meu esposo Tulio Thales, por sua capacidade de me trazer paz nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos, pelo incentivo constante e por tornarem a caminhada mais leve.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dr^a. Julia Maria Costa Cruz pela orientação neste trabalho, pela atenção e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos.

À Maria do Rosário Gonçalves Pires, por sempre estar presente não medindo esforços para ajudar, pelo carinho e pelas palavras certas sempre ditas nos momentos certos.

Ao mestre Edson Fernando Goulart de Carvalho por acompanhar de perto meu trabalho, me ensinado e ajudando nos momentos de dúvida e apreensão. Sua paciência e dedicação me tornaram uma pesquisadora melhor.

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, pelo carinho e incentivo em cada momento, e por partilharem comigo suas experiências.

Ao Programa de Pós Graduação e Imunologia e Parasitologia Aplicadas por todos suporte intelectual e tecnológico disponíveis.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro destinado a pesquisa.

Meu muito obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente dessa minha jornada.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

LISTA DE ABREVIACÕES

°C	Graus celsius
%	Por cento/porcentagem
µL	Microlitros
CEP/UFU	Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Federal de Uberlândia
CEUA/UFU	Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Federal de Uberlândia
E/S	Excreção/Secreção
ED	Eficiência diagnóstica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Es	Especificidade
Fn	Falso negativo
Fp	Falso positivo
G	Gravidade
H	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV	Vírus Linfotrópico da Célula T Humana
IB	<i>Immunoblotting</i>
IE	Índice ELISA
IS+	Imunossuprimidos positivos para <i>S. stercoralis</i>
IS-	Imunossuprimidos negativos para <i>S. stercoralis</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
J	Índice de Youden
kDa	Kilodaltons
L	Litro
L1	Larva rabditoide de primeiro estágio
L2	Larva rabditoide de segundo estágio
L3	Larva filarioide de terceiro estágio
L4	Larva filarioide de quarto estágio
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros

mM	MiliMolar
mmol	Milimol
n	Número de amostras
N/C	Não consta
DO	Densidade ótica
OPD	<i>Ophenylenediamine</i> (o-fenilenodiamina)
OP	Outras ParasitosesP
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato) adicionada de Tween 20
PBS-TM	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato) adicionada de Tween 20 e Leite em pó desnatado
pH	Potencial hidrogeniônico
P.M.	Peso Molecular
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio
Se	Sensibilidade
SE	Extrato Salino Total

St+	Imunocompetentes positivos para <i>S. stercoralis</i>
St-	Imunocompetentes negativos para <i>S. stercoralis</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TG-ROC	<i>Two-graph receiver operating characteristic</i>
Th1	Linfócitos T helper tipo1
Th2	Linfócitos T helper tipo2
Th17	Linfócitos T helper tipo17
v/v	Volume por volume
Vn	Verdadeiro negativo
Vp	Verdadeiro positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Epidemiologia.....	13
1.2 Aspectos biológicos de <i>Strongyloides stercoralis</i>	14
1.2.1 Morfologia.....	14
1.2.2 Ciclo Biológico.....	14
1.3 Aspectos clínicos da estrongiloidíase humana	15
1.4 Aspectos imunológicos na estrongiloidíase	16
1.5 Diagnóstico da estrongiloidíase humana.....	18
1.5.1 Diagnóstico parasitológico de fezes	18
1.5.2 Diagnóstico imunológico	18
1.6 Modelo Experimental.....	19
1.7 Antígenos de excreção/secreção	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Aspectos éticos	23
3.2 Obtenção de larvas L3 de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	23
3.3 Produção de extrato salino total de <i>S. venezuelensis</i>	24
3.4 Produção de antígenos de excreção/secreção de larvas L3 de <i>S. venezuelensis</i> em meio RPMI ou PBS	25
3.5 Amostras de soro	26
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	27
3.7 ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides stercoralis</i> em amostras de soro humano.....	28
3.8 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Perfil eletroforético para os três antígenos.....	30
4.2 Detecção de IgG por ELISA utilizando antígenos SE, E/S RPMI e E/S PBS	32
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

RESUMO

A estrogiloidíase humana é uma parasitose intestinal negligenciada com ampla distribuição mundial, podendo acarretar cronificação e hiperinfecção caso não seja diagnosticada precocemente. Os casos que merecem mais atenção são aqueles relacionados, principalmente, à pacientes imunocomprometidos. O diagnóstico parasitológico desta helmintose é pouco sensível devido a eliminação pequena e irregular de larvas nas fezes. Os métodos imunológicos, principalmente *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), apresentam elevada sensibilidade e especificidade. No entanto há sempre a necessidade de aprimorar e elevar a eficiência diagnóstica para evitar reatividade-cruzada e casos de resultados falsos-negativos. O objetivo deste estudo foi de produzir e padronizar antígenos de excreção/secreção (E/S) de larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis* para uso no imunodiagnóstico. As larvas L3 de *S. venezuelensis* foram obtidas para a produção de extrato salino total (SE), E/S no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e E/S em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Todos os antígenos foram utilizados na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* em doentes com e sem condições imunossupressoras. Utilizaram-se 150 amostras de soro humano, divididas em 5 grupos. Indivíduos imunocompetentes positivos para estrogiloidíase (n = 30) ou negativos para estrogiloidíase (n = 30); Pacientes com outros parasitas (n = 30), como ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis nana*, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* e *Taenia* sp; pacientes imunossuprimidos positivos para estrogiloidíase (N = 30), incluindo HIV, diabetes, alcoólatras, tuberculose, câncer e alcoólatras com câncer e pacientes imunossuprimidos negativos para parasitas intestinais (n = 30), incluindo HIV, diabetes, alcoolistas, tuberculose e câncer. Observou-se que todos os antígenos apresentaram frações antigênicas semelhantes com peso molecular de 62, 44, 39, 33 e 18 kDa. No entanto, quando utilizados em teste ELISA os antígenos E/S tanto em meio RPMI quanto em PBS apresentaram-se mais específicos que o SE, 94,4%, 96,7% e 77,8% respectivamente, enquanto que o antígeno E/S em PBS foi mais sensível (95,0%) que os outros dois antígenos (SE 93,3% e RPMI 86,7%). Os antígenos E/S apresentaram-se de fácil execução e o produto E/S em PBS mostrou-se mais sensível e específico que os demais antígenos em estudo. Concluiu-se que, o antígeno E/S em PBS é uma boa alternativa para diagnóstico mais sensível e específico da estrogiloidíase humana.

Palavras-Chave: Estrogiloidíase; imunodiagnóstico, antígenos, excreção/secreção; *Strongyloides venezuelensis*

ABSTRACT

Excretion / secretion antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to the diagnosis of human strongyloidiasis

Human strongyloidiasis is a neglected intestinal parasitosis, with a large worldwide distribution, affecting millions of people, and may lead to chronification and hyperinfection if not diagnosed early. The cases that deserve more attention are those related, mainly, to immunocompromised patients. The parasitological diagnosis of this helminth is not very sensitive due to the small and irregular larval output in the faeces. Immunological methods, especially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), present high sensitivity and specificity, however, there is always a need to improve and increase diagnostic efficiency to avoid cross-reactivity and cases of false-negative results. The aim of this study was to produce and standardize excretion/secretion (E/S) antigens of filarial larvae (L3) of *Strongyloides venezuelensis* for immunodiagnostic use. The L3 larvae of *S. venezuelensis* were obtained for the production of total saline extract (SE), E/S in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) and E/S in phosphate-buffered saline (PBS). All antigens were used in the detection of IgG anti- *S. stercoralis* in patients with and without immunosuppressive conditions. A total of 150 human serum samples were used, divided into 5 groups. Immunocompetent individuals positive for strongyloidiasis (n=30) or negatives for strongyloidiasis (n=30); patients with others parasites (n=30) such as hookworms, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis nana*, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura* and *Taenia* sp; immunosuppressed patients positive for strongyloidiasis (n=30), including HIV, diabetes, alcoholics, tuberculosis, cancer, and alcoholics with cancer and negative immunosuppressed patients for intestinal parasites (n=30) including HIV, diabetes, alcoholics, tuberculosis and cancer. All antigens were observed to have similar antigenic fractions having molecular weights of 62, 44, 39, 33 and 18 kDa. However, when used in the ELISA test the E/S antigens in both RPMI and PBS media were more specific than SE, 94.4%, 96.7% and 77.8%, respectively, whereas the antigen E/S in PBS was more sensitive (95.0%) than the other two antigens (SE 93.3% and RPMI 86.7%). The E/S antigens were easy to perform and the E/S product in PBS was more sensitive and specific than the other antigens in the study. It may conclude that the E/S in PBS antigen is a good alternative for a more sensitive and specific diagnosis of human strongyloidiasis.

Keywords: Strongyloidiasis; immunodiagnosis, antigens, excretion/secretion, *Strongyloides venezuelensis*

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Strongyloides* foi definido em 1879 por Grassi, após a descoberta do médico francês Louis Normand, ao examinar fezes diarreicas de soldados que exerceram atividade no Vietnã. A demonstração de que no ciclo de vida desse parasito ocorre uma fase estercoral constituída por parasitos de vida livre e outra fase intestinal representada pela fêmea parasita originou a denominação *Strongyloides stercoralis*, Stiles e Hassall, 1902 (“Strongylus” = arredondados; “oides” = semelhantes; “stercus” = esterco) (GROVE, 1996). Ribeiro da Luz reportou pela primeira vez em 1880, no Estado do Rio de Janeiro, a importância de *S. stercoralis* como agente etiológico da estrongiloidíase no Brasil e, posteriormente, em 1948, Moraes enfatizou a importância médico-sanitária dessa parasitose (MORAES, 1948; MAIA et al., 2006; COSTA-CRUZ, 2016).

Os nematódeos deste gênero pertencem ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabditida, família Strongyloididae a qual é composta por parasitos de interesse médico e veterinário (REY, 2001). Admite-se 52 espécies do gênero *Strongyloides* que podem ser encontradas em aves, répteis, anfíbios, mamíferos domésticos e silvestres e no homem causando a estrongiloidíase (GROVE, 1996).

A estrongiloidíase é, normalmente, autolimitada e de baixa morbidade em indivíduos imunocompetentes. No entanto, nos casos de imunocomprometimento o quadro de infecção pode agravar, pois estes pacientes imunocomprometidos, seja por tratamento com corticosteróides ou alguma doença imunossupressora como AIDS, HTLV-1, tuberculose, alcoolismo, diabetes, têm resposta imunológica comprometida, ficando predispostos ao desenvolvimento de complicações graves causadas por *S. stercoralis* (KEISER, NUTMAN, 2004; VAIYAVATJAMAI et al., 2008; MONTES et al., 2009; CABRAL et al., 2015)

1.1 Epidemiologia

Strongyloides stercoralis (BAVAY, 1876) é um nematódeo de importância clínica para o homem, infectando mundialmente de 30 a 100 milhões de pessoas, sendo comumente encontrado em países tropicais e subtropicais que apresentem condições ambientais, como calor e umidade, e condições sanitárias favoráveis, acometendo também indivíduos que residiram ou viajaram para regiões endêmicas (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013; ANDERSON et al., 2014; PAGE, SPEARE, 2016). Apesar de apresentar distribuição mundial heterogênea, a estrongiloidíase ocorre com maior frequência do Sudoeste da Ásia, Colômbia, Brasil, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África, ilhas caribenhas e algumas regiões dos Estados Unidos (GENTA, 1989; FARDET et al., 2007; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR et al., 2013; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015).

A prevalência da estrongiloidíase pode ser definida em três categorias diferentes, a partir da porcentagem de pessoas infectadas: esporádica, quando menor que 1%, endêmica se variar entre 1 e 5 % e hiperendêmica quando for maior que 5%. Neste sentido, o Brasil é considerado um país hiperendêmico por apresentar 5,5% da população infectada pelo parasito, considerando o diagnóstico parasitológico de fezes (PIRES, DREYER, 1993; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; TEIXEIRA et al., 2016).

1.2 Aspectos biológicos de *Strongyloides stercoralis*

1.2.1 Morfologia

O helminto *S. stercoralis* apresenta mudanças morfológicas, em seu ciclo de vida, que envolvem cinco formas evolutivas.

As larvas filarioides, infectantes, medem cerca de 600 µm de comprimento, possuem esôfago longo e cilíndrico, típico para este estágio, do tipo filariforme; vestíbulo bucal curto; e apresentam extremidade característica designada cauda entalhada. A fêmea partenogenética tem um aspecto filariforme por apresentar um esôfago do tipo filariforme, porém maior que as larvas infectantes, medindo 2 mm de comprimento; sua extremidade anterior é arredondada e a posterior afilada. Os vermes adultos são distinguidos em machos e fêmeas de vida livre, sendo que os machos são menores com, aproximadamente, 700 µm de comprimento, e as fêmeas são maiores medindo de 0,8 a 1,2 mm; ambos apresentam esôfago rabditoide e extremidade afilada. Os ovos de *S. stercoralis* são elípticos, de casca fina, medindo cerca de 50 µm e possuem uma larva do tipo rabditoide em seu interior. E larvas rabditoides apresentam comprimento de aproximadamente 250 µm, com esôfago tipicamente rabditoide, subdividido em corpo, istmo e bulbo; vestíbulo bucal curto; e cauda ponteaguda (NEVES, 2009; DE CARLI, TASCA, 2014).

1.2.2 Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *S. stercoralis* é complexo quando comparado a outros nematódeos alternando entre ciclo de vida livre e parasitário (MORAES, 1948; GENTA, 1989; IRIEMENAM, et al., 2010). A estrongiloidíase é adquirida pela penetração de larvas filarioides infectantes (L3) na pele intacta que, ao atingirem a corrente sanguínea, migram

para os pulmões e alcançam os alvéolos, a partir dos capilares pulmonares, onde se transformam em larvas filarioides de estágio L4. Estas, por sua vez, ascendem até alcançarem a laringe sendo então deglutidas e após o estágio de L5 evoluem para fêmeas partenogênicas na mucosa do intestino delgado (PORTO et al., 2001; COSTA-CRUZ, 2016).

O parasito adulto libera de 30 a 40 ovos por dia que amadurecem e eclodem para liberar larvas rabditoides L1, estas migram para a luz intestinal e sofrem muda para larvas rabditoides L2. Tanto larvas L1 quanto L2 são excretadas com as fezes e terão um ciclo evolutivo distinto, a depender de suas características genéticas, ou seja, podem ser transformadas em vermes adultos (machos e fêmeas) de vida livre, que darão origem a larvas infectantes de terceiro estágio a partir de reprodução sexuada, contemplando um ciclo indireto, ou essas larvas excretadas nas fezes poderão sofrer muda para larvas infectantes L3, promovendo um ciclo direto (GROVE, 1996; VINEY, 2006; NEVES, 2009 COSTA-CRUZ, 2016). De modo peculiar, pode ocorrer a chamada auto-endo-infecção, responsável pelo desenvolvimento das formas graves da estrogiloidíase. Na luz do intestino, as larvas rabditoides se transformam em filarioides infectante que vão penetrar na mucosa perirretal, retornar para o sistema circulatório e reiniciar o ciclo. Esta situação irá aumentar a carga parasitária e a permanência do parasito no hospedeiro (PORTO et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2016).

1.3 Aspectos clínicos da estrogiloidíase humana

A interação entre *S. stercoralis* e o homem pode variar conforme a carga parasitária, condição nutricional e o estado imunológico do hospedeiro. Em torno de 50 % de portadores de estrogiloidíase são imunocompetentes, podendo ser assintomáticos e apresentar sintomatologia branda ou ainda desenvolver uma infecção crônica. Pacientes

imunocomprometidos por diferentes causas, podem desenvolver hiperinfecção que se caracteriza por hemorragia gastrointestinal e pulmonar, infecções bacterianas e fúngicas secundárias devido ao extravasamento da flora intestinal em virtude de lesões do intestino por larvas em movimento. (SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDRÉ et al., 2006; MONTES et al., 2009).

Os casos de hiperinfecção por *S. stercoralis* são resultados de alterações no sistema imunológico de pacientes que evoluíram para autoinfecção. Estes indivíduos apresentarão sinais e sintomas decorrentes da migração larval pelos pulmões e trato intestinal, como asma recorrente, exacerbação dos sintomas gastrointestinais e detecção de grande número de larvas no escarro e nas fezes. Mas, outros pacientes poderão apresentar infecção disseminada, indicada pelo achado de larvas infectantes em qualquer órgão ou sistema, como nódulos linfáticos, rins, pâncreas, músculos esqueléticos e outros. Neste caso, em particular, a doença pode ser fatal devido a rápida evolução e diagnóstico tardio (TEIXEIRA et al., 2016).

Por apresentar um complexo ciclo biológico, ausência de sintomatologia na maioria dos casos e por vezes, quando sintomática, produzir síndromes pulmonares e digestivas comuns a outras doenças, o diagnóstico de estrogiloidíase é dificultado (SUDRÉ et al., 2006; REY, 2010).

1.4 Aspectos imunológicos na estrogiloidíase

Os helmintos, de modo geral, provocam uma resposta imune dependente de linfócitos T CD4+, relacionada a um perfil Th2 que se caracteriza pela produção de interleucinas envolvidas na sinalização celular. Estas, por sua vez, induzem resposta humoral mediada por anticorpos IgE e, também, resposta celular mediada por mastócitos, basófilos e eosinófilos

(ONAH; NAWA, 2000; MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; COSTA-CRUZ, 2016). Além de IgE, também são produzidos anticorpos específicos das classes IgM, IgA e IgG, sendo esta última a principal imunoglobulina presente no soro do hospedeiro quando ocorre uma infecção por *S. stercoralis*. Entre as subclasses de IgG, há a formação de IgG1 e IgG4 para uma resposta mais elaborada contra este parasito (MACHADO, et al., 2005; RODRIGUES, et al., 2007).

A infecção por *S. stercoralis* pode se erradicar ou evoluir para cronicidade com casos de hiperinfecção (COSTA-CRUZ, 2016). Em ambos os casos é o sistema imune do hospedeiro que determinará a evolução da doença, sendo demonstrado que a resposta de perfil Th2 é essencial, e os portadores de estrogiloidíase produzem anticorpos específicos dos isotipos IgM, IgG, IgA e IgE (HIRATA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; MACHADO et al., 2009, 2011; NUTMAN, 2016). Considerando-se os casos de imunossupressão, há aumento acentuado da carga parasitária que acarretará em síndrome de hiperinfecção, como ocorre em pacientes com HTLV-1. Estes apresentarão proliferação espontânea de linfócitos T e produção de altos níveis de interferon- γ relacionados com resposta imune tipo Th-1, bem como produção de baixos níveis de interleucina-4, interleucina-5, interleucina-10 e interleucina-13 que apresentam importante papel na resposta imune tipo Th-2. Deste modo, é sugerido que a co-infecção de estrogiloidíase e HTLV-1 tem papel importante na modulação negativa na resposta imune do tipo Th-2 (HIRATA et al., 2006; MARCOS et al., 2008; ROXBY, GOTTLIEB, LIMAYE, 2009; BON et al., 2010; MEJIA, NUTMAN, 2012; TOLEDO, MUÑOZ-ANTOLI, ESTEBAN, 2015).

1.5 Diagnóstico da estrogiloidíase humana

1.5.1 Diagnóstico parasitológico de fezes

O diagnóstico da estrogiloidíase é realizado a partir de sinais clínicos e sintomas, mas principalmente pela identificação de larvas rabditoides e/ou larvas filarioides de *S. stercoralis*. Os testes laboratoriais permitem, em sua maioria, demonstrar a presença de larvas do parasito nas fezes, mas também em escarro, líquidos orgânicos ou em materiais de biopsia quando se trata de casos mais graves. Os exames coproscópicos, como Baermann-Moraes, Rugai, Harada-Mori são os métodos clássicos para confirmar o parasitismo. No entanto, são técnicas que apresentam baixa sensibilidade devido à baixa carga parasitária e ao pequeno número de larvas eliminadas de forma esporádica. A cultura em placa de ágar tem sido o método recomendado pela maior sensibilidade e possibilidade de diferenciação mais precisa com os ancilostomídeos (PAULA et al., 2000; SIDDIQUI; BERK, 2001; REY, 2010; ANDERSON et al., 2014, LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014; BOUNFRATE et al., 2015). Para aumentar essa sensibilidade dos métodos de rotina seriam necessárias análises de, no mínimo, três amostras em dias alternados, por diferentes métodos. Mas, raras vezes o diagnóstico é realizado com o total de sete amostras, devido a relutância tanto dos médicos quanto dos pacientes, por se tratar de um procedimento inconveniente e demorado. (TEIXEIRA et al., 2016).

1.5.2 Diagnóstico imunológico

Os métodos imunológicos são auxiliares no diagnóstico da estrogiloidíase por avaliar a resposta imunológica do hospedeiro assintomático podendo ser utilizados na triagem de paciente com diagnóstico clínico sugestivo. (REY, 2010; COSTA-CRUZ, 2016). Os testes de

imunofluorescência indireta (RIFI), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *immunoblotting* (IB) destacam-se por apresentarem elevadas taxas de sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos específicos ao parasito. Essas características são imprescindíveis, pois complementam a análise parasitológica tradicional, simplificando o diagnóstico e superando a baixa sensibilidade dos exames de fezes (MACHADO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010; KROLEWIECKI et al., 2013; BOUNFRATE et al., 2015).

1.6 Modelo Experimental

Dentre as limitações para a padronização de testes imunológicos está a dificuldade em se obter e manter larvas filarioides de *S. stercoralis* em laboratório. Assim, tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos provenientes de *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezuelensis* que infectam as mesmas espécies de roedores, e são fáceis de manter em laboratório. A composição antigênica das espécies tem se demonstrado bastante compatível, sendo que essas espécies podem ser utilizadas na obtenção de antígeno heterólogo e sua consequente aplicação no imunodiagnóstico da strongiloidíase humana substituindo o antígeno de *S. stercoralis* (COSTA-CRUZ et al., 2003; MACHADO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; GONZAGA et al., 2011; VINEY, KIKUCHI, 2015).

1.7 Antígenos de excreção/secreção

Os produtos de excreção/secreção (E/S) constituem proteínas importantes, que desempenham funções biológicas vitais em organismos vivos que vão desde bactérias até mamíferos, podendo apresentar 20% do proteoma de um organismo. Essas proteínas, por

estarem presentes no espaço extracelular e superfície celular, podem estar envolvidas em processos celulares vitais e, até mesmo, na regulação da resposta imune do hospedeiro. Por suas características vitais a um organismo vivo, as proteínas E/S tornaram-se foco de pesquisas imunológicas de helmintos, pois estes parasitos são capazes de modificar e adaptar seu ciclo biológico dentro de um hospedeiro, no objetivo de evadir ao ataque do sistema imunológico. Modelos de estudo como *S. venezuelensis* ou *S. ratti*, para obtenção de produtos E/S, são vantajosos pois estes apresentam um ciclo de vida relativamente curto e de fácil manutenção (NAGARAJ et al., 2008; SOBLIK et al., 2011). Alguns estudos já foram realizados com as espécies de *S. stercoralis* e *S. ratti* e outros helmintos, a fim de procurar entender o comportamento dos produtos de excreção e secreção, e suas diversas formas de produção *in vitro*, como mostrado na tabela 1. No entanto, estudos com *S. venezuelensis* no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana ainda não foi reportado.

Desta forma, sabe-se que o estudo da estrogiloidíase humana torna-se cada vez mais importante devido aos casos de infecções crônicas assintomáticas com baixa eliminação de larvas nas fezes, assim como ao fato de ser potencialmente fatal em casos de hiperinfecção e em indivíduos imunossuprimidos. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de métodos diagnósticos que apresentem bons parâmetros, ou seja, mais sensíveis e específicos. De tal forma, este estudo visa inovar e otimizar o diagnóstico da estrogiloidíase humana a partir da utilização inédita do antígeno de E/S de *S. venezuelensis*.

Tabela 1: Relação dos estudos com produtos de excreção/secreção em diferentes helmintos e diferentes espécies do gênero *Strongyloides*

Parasito/ Forma evolutiva	Número de parasitos	Tempo	Incubação	Meio	Dosagem	Autor (Ano)
<i>Strongyloides stercoralis</i> / L3	50.000 a 100.000	24-48 h	33°C- 8% CO2	DMEM + antibióticos	N/C	BRINDLEY et al. (1988)
<i>Toxocara canis</i> / L3	N/C	N/C		N/C	Bradford	CAMARGO et al. (1992)
<i>Ancylostoma caninum</i> / L3	250	24 h	37°C- 5% CO2	RPMI + HEPES + antibióticos	N/C	HAWDON, DATU (2003)
<i>Anisakis simplex</i> / L3	60	N/C	37°C- 5% CO2	RPMI + antibióticos PBS + antibióticos	N/C	HWANG et al. 2003
<i>S. stercoralis</i> / adulto	10	6 h	37°C	PBS	Lowry et al.	EL-BRADY(2009)
<i>Strongyloides ratti</i> / L3	30.000	24 h	37°C	RPMI + HEPES + antibióticos	N/C	SOBLIK et al. (2011)

L3= larva filarioide de terceiro estágio; DMEM= *Dulbecco Modification of Minimum Essential Media*; RPMI= *Roswell Park Memorial Institute*; HEPES= *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*; PBS= *Phosphate buffered saline*; N/C= não consta no artigo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Produzir antígenos de excreção/secreção (E/S) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* para utilização no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Produzir antígeno Excreção/Secreção de larvas filarioides de *S. venezuelensis* “in vitro”.
- ✓ Comparar dois meios distintos na produção de antígeno de excreção/secreção.
- ✓ Diferenciar os antígenos de excreção/secreção por meio de SDS-PAGE.
- ✓ Avaliar a detecção de IgG por ELISA em amostras de soro humano utilizando antígenos de excreção/secreção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa em humanos sob protocolo 1.172.751, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As amostras de soro humano utilizadas neste estudo estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, e sua manutenção foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFU) sob o protocolo de nº 041/2008.

A cepa de *S. venezuelensis* foi mantida em conformidade com projeto “Manutenção da cepa de *Strongyloides venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar” aprovado sob o parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) de nº 075/2008.

3.2 Obtenção de larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis*

A cepa L-2 de *S. venezuelensis* (BRUMT, 1934) utilizada neste estudo foi obtida a partir de fezes do roedor selvagem da espécie *Bolomys lasiurus* (abril de 1986), e mantida por sucessivas passagens em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil. Os animais foram inoculados subcutaneamente com larvas L3, e após 8 dias de infecção as fezes foram coletadas e cultivadas em carvão. As culturas foram

armazenadas a 28 ° C durante 72 h, em estufa BOD, de acordo Loss (IN: NEVES et al., 2016). As larvas L3 foram colhidas e concentradas utilizando o método Rugai et al. (1954), sendo parte utilizada na infecção de novos animais para manutenção da cepa, e outra parte utilizada na produção do extrato salino total e dos antígenos de excreção/secreção (E/S).

As larvas obtidas para produção de antígenos foram transferidas para um tubo cônico contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,1 mol/L, pH 7,2), adicionado com hipoclorito de sódio a 0,25%, suplementado com 100 U/mL de Penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina; seguido de centrifugação a 1280 x g durante 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as larvas passaram por três ciclos de lavagem com PBS suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Entre cada passo de lavagem, o tubo foi centrifugado a 1280 x g durante 5 min. No final dos ciclos de lavagem, as larvas foram coletadas e utilizadas para a produção de SE e antígeno E/S *in vitro*.

3.3 Produção de extrato salino total de *S. venezuelensis*

O extrato salino total foi produzido de acordo com Gonzaga et al. (2011) com modificações. Aproximadamente 300.000 larvas filarioides L3 de *S. venezuelensis* foram ressuspensas em PBS (0,1 mol/L, pH 7,2) com a adição de inibidores de protease (ULTRA minicomplete, Roche, Mannheim, Alemanha) e rompidas por 10 ciclos de congelamento (1 min, -196 °C) e descongelamento seguido por maceração. A solução foi então centrifugada a 12.400 x g durante 30 min. a 4 °C, e recolheu-se o sobrenadante (SE). A dosagem proteica foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e o SE de larvas L3 de *S. venezuelensis* foi então armazenado a -20 °C até sua utilização.

3.4 Produção de antígenos de excreção/secreção de larvas L3 de *S. venezuelensis* em meio RPMI ou PBS

O antígeno de excreção/secreção (E/S) foi produzido *in vitro* de acordo com Soblik et al., 2011, com modificações. As larvas L3, obtidas conforme descrito anteriormente, foram transferidas para placas de cultura de 12 poços contendo meio RPMI 1640 (meio Roswell Park Memorial Institute 1640) suplementado com HEPES [4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico] 10 mM, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) ou PBS acrescido de penicilina e estreptomicina em uma concentração de 30.000 larvas/mL/poço. As placas contendo larvas L3 em meio RPMI ou PBS permaneceram em estufa a 37 °C durante 24 h e o meio foi recolhido e substituído por novo meio a cada 24 h, mantendo as larvas viáveis durante um período máximo de 72 h. O meio recolhido foi centrifugado a 1.280 x g durante 5 min e o sobrenadante foi recolhido e adicionado 100 µL/mL de inibidor de protease (ULTRA mini, Roche, Mannheim, Alemanha).

Os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de larvas foram concentrados em Amicon® Ultra-15 10K Centrifuge Filter (Merck Millipore Ltd. Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda) com centrifugação a 5000 x g durante 20 min a 4 °C. Os produtos antigênicos, após concentração, em meio RPMI e PBS foram dosados pelo método de Lowry et al. (1951) e armazenado a -20 °C para posterior uso.

3.5 Amostras de soro

Para avaliar a detecção de anticorpo IgG anti-*S. stercoralis*, 150 amostras de soro humano foram utilizadas, divididas em 5 grupos:

St + (Imunocompetentes positivos para *S. stercoralis*): 30 amostras de pacientes imunocompetentes, com diagnóstico parasitológico positivo para a estrogiloidíase.

St- (Imunocompetentes negativos para *S. stercoralis*): 30 amostras de indivíduos saudáveis, imunocompetentes e negativos para parasitas intestinais em exame parasitológico de fezes.

OP (Outras parasitoses): 30 amostras de pacientes com outras doenças parasitárias, incluindo: (n= 4) Ancilostomídeos, (n= 5) *Ascaris lumbricoides*, (n= 4) *Hymenolepis nana*, (n= 4) *Giardia lamblia*, (n= 3) *Schistosoma mansoni*, (n= 6) *Enterobius vermicularis*, (n= 1) *Trichuris trichiura*, (n= 3) *Taenia* sp.

IS+ (Imunossuprimidos positivos para *S. stercoralis*): 30 amostras de pacientes imunossuprimidos (n= 4 AIDS, n= 4 diabéticos, n= 10 etilistas, n = 5 tuberculose, n= 6 câncer, n= 1 etilista + câncer).

IS- (Imunossuprimidos negativos para *S. stercoralis*): 30 amostras de indivíduos imunossuprimidos (n= 9 AIDS, n= 4 diabetes, n= 6 etilistas, n= 3 tuberculose, n= 8 câncer), negativos para parasitos intestinais.

Os pacientes imunocompetentes positivos e negativos para *S. stercoralis* e imunossuprimidos positivos e negativos para *S. stercoralis* tiveram diagnóstico confirmado por exame parasitológico de fezes, realizado em três amostras cada pelos métodos Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e Hoffman, Pons e Janer (1934). Os

pacientes positivos para outras parasitoses tiveram diagnóstico parasitológico confirmado pelo método de Ritchie (1948) com três amostras cada.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para avaliar o perfil eletroforético dos antígenos em estudo, os mesmos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, conforme descrito por Laemmli, 1970.

O gel foi montado entre placas de vidro com espaçadores de 0,75mm de espessura. Para a preparação do gel de separação foi utilizado Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 (Vetec); SDS (Dodecil Sulfato de Sódio, Pharmacia NJ, EUA) a 1%; EDTA (ácido etileno-dianimo-tetra-acético, Gibco-Brl, NY, USA) a 2 mM; solução de acrilamida (Pharmacia) a 30%; bisacrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida, Sigma Chem. Co., St Louis, MO) a 0,8%; água destilada; TEMED (N,N,N,N-tetrametil-amonometano, Sigma) a 0,125% a APS (persulfato de amônio, Vetec, RJ, Brasil) a 0,125%.

Em seguida, foi realizada a preparação do gel de empilhamento utilizando Tris-HCl 0,125M, pH 6,8; SDS 0,1%; EDTA a 2mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida a 1%; água destilada; TEMED a 0,125% e APS a 0,125%. Sendo este depositado sobre o gel de separação e moldado com o “pente” para formação de poços para aplicação das amostras. Após polimerização completa, foram aplicados 20 µL de cada antígeno diluídos em tampão de amostra (10 mmol/L de tampão Tris/HCl (pH 8,0) contendo 1 mmol/L de EDTA, 2% de SDS, 10% de glicerol e 2,5% (v/v) de β-mercaptoetanol) em uma proporção 1:9, previamente incubados a 100 °C por 5 min em banho-maria. As amostras foram executadas em simultâneo

com o padrão de peso molecular Marker Recom™ Blue Range Wide Range (N.º de catálogo RE001, Royal Biotech Corporation e RBC, Taiwan) no sistema de electroforese vertical miniVE SE-300-10A-10 (Hoefer, Inc., San Francisco, EUA). O gel foi corado por nitrato de prata de acordo com Friedman (1982), modificado com aceleração por aquecimento em micro-ondas, para posterior análise.

3.7 ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides stercoralis* em amostras de soro humano

As amostras de soro humano foram analisadas por ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis*, de acordo com Feliciano et al., 2010. Microplacas de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-one, Alemanha) foram sensibilizadas com 50 µL/poço dos antígenos SE ou E/S (RPMI ou PBS) de larvas L3 de *S. venezuelensis* diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 a uma concentração de 5 µg/mL, e incubou-se *overnight* a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com PBS contendo Tween-20 (PBS-T) durante 5 min e depois bloqueadas com 200 µL de leite em pó desnatado diluído em PBS-T a 3% (PBS-TM 3%) durante 30 min a 37 ° C em câmara úmida. Após novo processo de três lavagens por 5 min em PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço das amostras de soro diluídas em PBS-T (1:80) e incubadas durante 45 min a 37 ° C. As placas foram novamente lavadas três vezes de 5 min com PBS-T, e então foram adicionados 50 µL de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma-AldrichCo., Deisenhofen, Alemanha) com titulação ótima de 1:2000 durante 45 min a 37 °C. Depois de três ciclos de lavagem de 5 min em PBS-T, a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato H₂O₂ (Merck KGaA® Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e solução cromógena o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-AldrichCo., Deisenhofen, Alemanha). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo

da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 μL de solução de H_2SO_4 2N. Os valores de densidade óptica (OD) foram determinados a 492 nm em leitora de ELISA (Polaris, Celer Biotecnologia S / A, Belo Horizonte MG, Brasil). Os dados foram expressos em Índice ELISA (IE) como se segue: $\text{IE} = \text{OD}/\text{cut-off}$, onde o *cut-off* foi a média de todos os soros negativos mais três desvios padrão.

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o pacote de dados GraphPad 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os valores de IE foram submetidos ao "*two-graph receiver operating characteristic*" (TG-ROC), que avalia simultaneamente os valores de sensibilidade e especificidade para determinar o ponto ótimo da reação de todos os antígenos (GREINER, SOHR, GÖBEL, 1995). Os valores de IE acima do ponto de reação ótimo foram considerados positivos. Para dados não paramétricos, utilizou-se a análise estatística de Kruskal-Wallis para julgamento entre os diferentes grupos para o mesmo antígeno e a variância de Friedman para análise dos mesmos grupos em diferentes antígenos, com $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

A sensibilidade, especificidade e a eficiência diagnóstica (ED), bem como valores preditivos positivos (VPP), valores preditivos negativos (VPN) e índice de Youden foram calculados de acordo com Mineo et al., 2005.

Para a análise qualitativa de frações proteicas no perfil electroforético, foi utilizado o software ImageJ 1.48 (Instituto Nacional de Saúde Mental, Bethesda, Maryland, EUA) para determinar os pesos moleculares das frações com base nos valores do padrão de peso molecular.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil eletroforético para os três antígenos

A Figura 1 mostra o perfil eletroforético dos antígenos SE, E/S RPMI e E/S PBS de larvas L3 de *S. venezuelensis* depois da corrida em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) e coloração com nitrato de prata. O antígeno SE apresentou frações de proteína com pesos moleculares variando de 2 a 110 kDa em um total de 13 frações proteicas, o antígeno E/S RPMI exibiu frações que variaram de 6 a 62 kDa e o antígeno E/S PBS apresentou frações de peso molecular de 15 a 240 kDa, ambos com um total de nove frações de proteínas. Frações proteicas de 62, 44, 39, 33 e 18 kDa foram compartilhadas entre todos os antígenos, enquanto frações de 110, 25, 22, 16 e 2 kDa estavam presentes apenas no antígeno SE, fração de 48 kDa e frações de 240 e 55 kDa estavam presentes apenas nos antígenos E/S RPMI e E/S PBS, respectivamente.

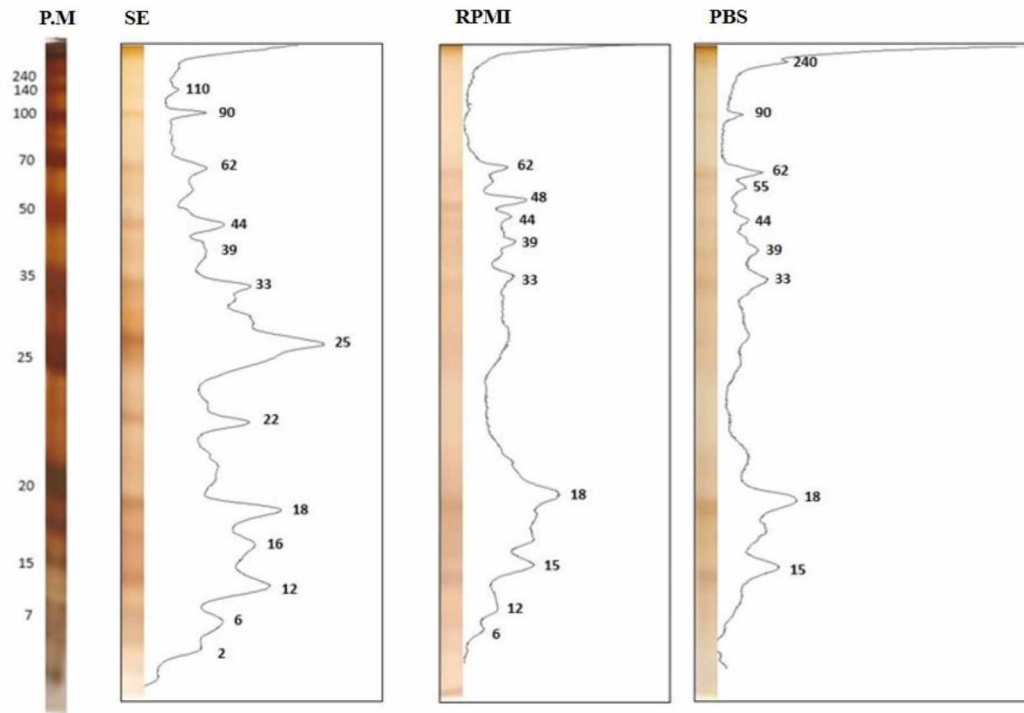


Figura 1: Perfis eletroforéticos dos antígenos extrato salino (SE), excreção/secreção (E/S) em meio RPMI e em PBS de larvas filarioides L3 de *Strongyloides venezuelensis*, com base no peso molecular padrão (P.M.) em SDS-PAGE a 12% e coloração por nitrato de prata; análise pelo software ImageJ, com pesos moleculares apresentados em kilodaltons (kDa).

4.2 Detecção de IgG por ELISA utilizando antígenos SE, E/S RPMI e E/S PBS

Os períodos de sobrevivência de larvas L3 de *S. venezuelensis* em cultura variaram de 24 h a 120 h para as mantidas em meio RPMI e de 24 a 72 h para as mantidas em PBS, sendo que a uma maior sobrevivência para as larvas cultivadas em meio RPMI suplementado ocorreu, possivelmente, devido à presença de substratos orgânicos, por isso padronizou-se os experimentos em um período máximo de 72 horas para ambas as culturas, desde que trocado o meio a cada 24 h.

O ponto ótimo da reação determinado pela curva TG-ROC, entre os antígenos (SE, E/S RPMI e E/S PBS), foi igual a 1,2 como mostra a figura 2.

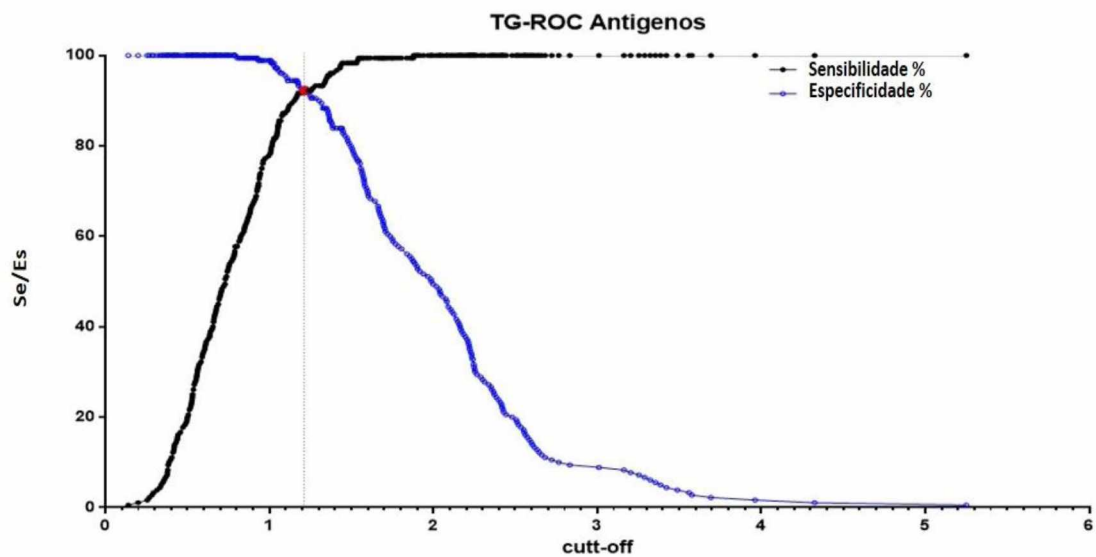


Figura 2: Determinação do *cut-off* através da curva TG-ROC, relacionando especificidade (Es) e sensibilidade (Se) entre todos os antígenos utilizados no estudo.

A partir dessa determinação, o ELISA foi analisado comparando os cinco grupos de pacientes para cada antígeno (Figura 3), mostrando que houve diferença estatística entre os grupos. Na análise da detecção de IgG pelo antígeno SE, foram observadas diferentes comparações estatísticas entre os grupos, $P < 0,05$ entre St- e OP; $P < 0,01$ entre OP e IS +, OP e IS-; $P < 0,005$ entre St + e OP; $P < 0,001$ entre St + e St-, St + e St-, St- e IS +, IS + e IS-. Ao se analisar a detecção de IgG a partir dos antígenos RPMI e PBS E/S, observou-se diferença estatística, com $P < 0,001$, entre St + e St-, St + e OP, St + e IS-, St- e IS +, OP e IS +, IS + e IS-. Ao comparar os três antígenos utilizados no estudo e os respectivos grupos, tanto E/S RPMI e E/S PBS apresentaram maior especificidade quando observados os grupos de outras parasitoses (OP), uma vez que o antígeno SE apresentou maior número de falsos positivos para esse mesmo grupo (Figura 4). A detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis* apresentou uma estatística de $P < 0,05$ entre o grupo IS- de RPMI e SE e entre o grupo St + de PBS e SE; $P < 0,01$ entre o grupo IS + de RPMI e SE; $P < 0,001$ entre o grupo St + de RPMI e SE, OP de PBS e SE, OP de RPMI e SE e IS + de RPMI e PBS.

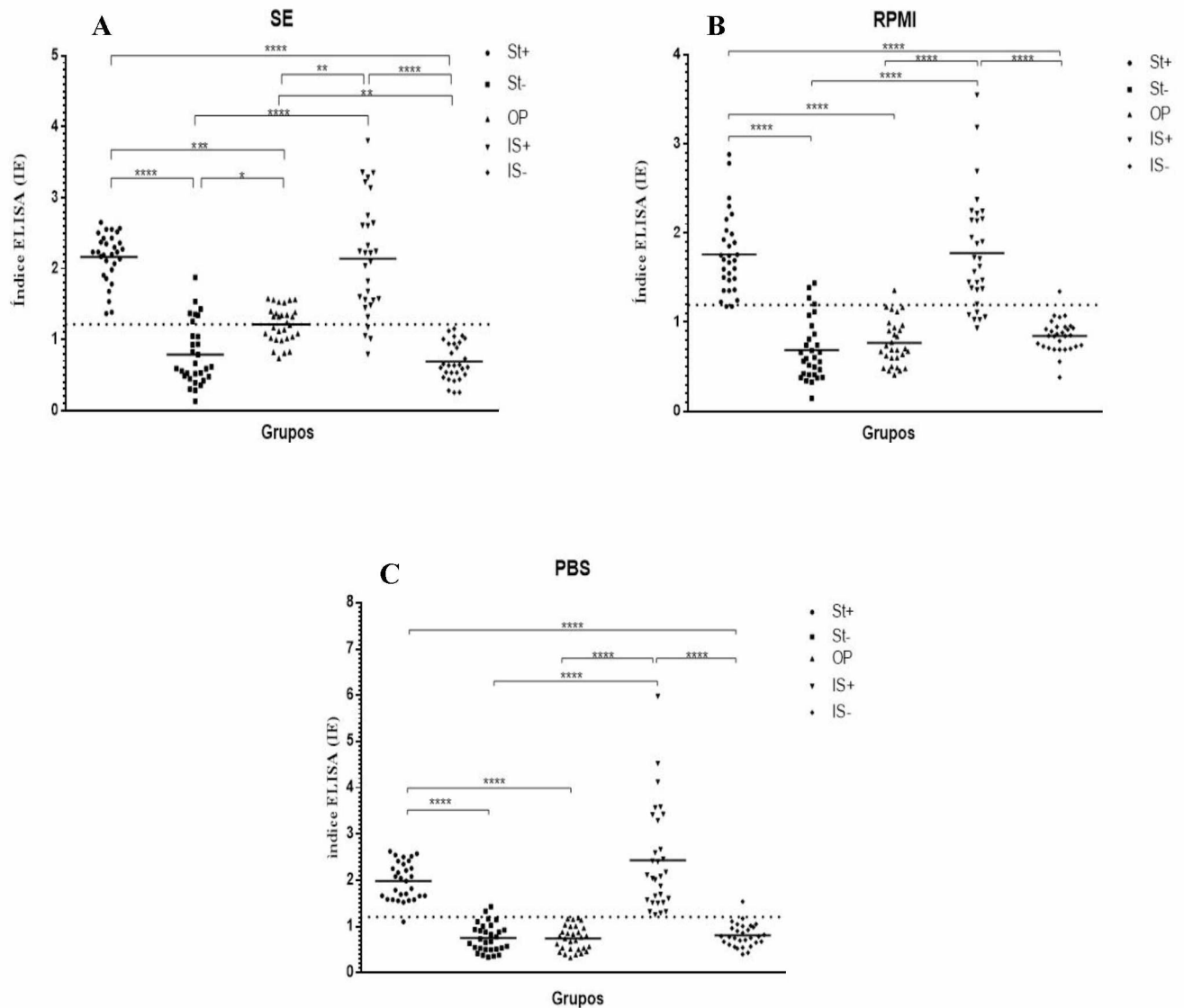


Figura 3: Detecção de IgG por ELISA utilizando antígeno SE (A), antígeno de E/S em meio RPMI (B) e antígeno de E/S em PBS (C), de larvas L3 de *S. venezuelensis*, comparando entre os diferentes grupos de pacientes: Imunocompetentes positivos para *S. stercoralis* (St+), Imunocompetentes negativos para parasitoses intestinais (St), Outras parasitoses (OP), Imunosuprimidos positivos para *S. stercoralis* (IS+) e Imunosuprimidos negativos para parasitos intestinais (IS-). As linhas pontilhadas indicam o limiar de reatividade da TG-ROC (=1,2). Considerado estatisticamente significativo: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$, **** $P < 0,001$.

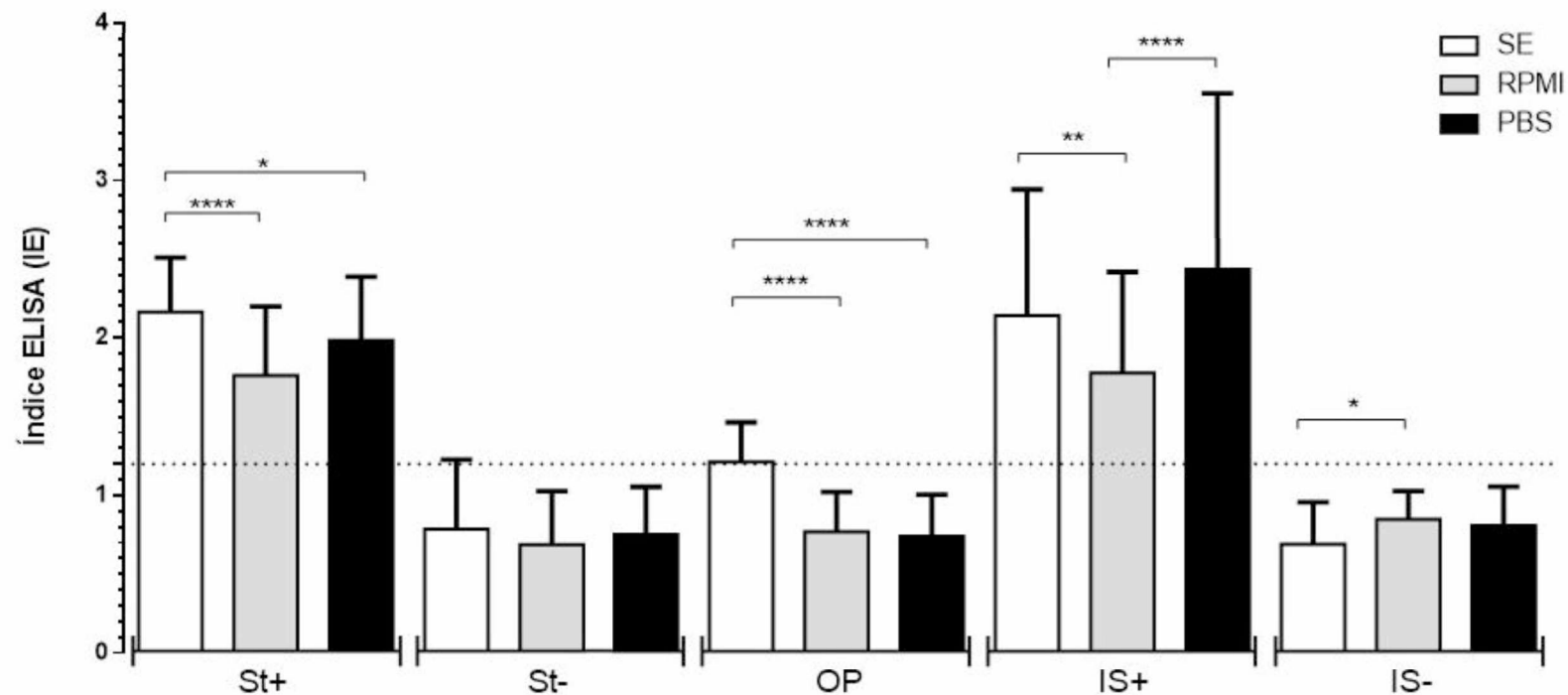


Figura 4: Detecção de IgG por ELISA comparando os diferentes antígenos *S. venezuelensis* (Extrato Salino Total, Excreção/Secreção em meio RPMI e Excreção/Secreção em PBS) entre os respectivos grupos de pacientes: Imunocompetentes positivos para *S. stercoralis* (St+), Imunocompetentes negativos para parasitoses intestinais (St-), Outras parasitoses (OP), Imunosuprimidos positivos para *S. stercoralis* (IS+) e Imunosuprimidos negativos para parasitos intestinais (IS-). A linha pontilhada indica o limiar de reatividade da TG-ROC (=1,2). Como significância estatística: *P<0,05; **P<0,01; ****P<0,001.

O antígeno E/S PBS apresentou maiores valores de sensibilidade (95,0%), especificidade (96,7%), eficiência diagnóstica (96,0%). Os dados referentes à sensibilidade, especificidade, eficiência diagnóstica, valores preditivos positivos, valores preditivos negativos e Índice de Youden calculados para os testes ELISA são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Sensibilidade, especificidade, eficiência diagnóstica (ED), valores preditivos positivos (VPP), valores preditivos negativos (VPN) e Índice de Youden (J) na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando extrato salino total (SE), antígeno de excreção/secreção em meio RPMI e antígeno de excreção/secreção em PBS, no teste ELISA.

Amostras	ELISA					
	Sensibilidade	Especificidade	ED (%)	VPP	VPN	J
Antigênicas	(%)	(%)				
SE	93,3	77,8	84,0	0,74	0,95	0,71
RPMI	86,7	94,4	91,3	0,91	0,91	0,81
PBS	95,0	96,7	96,0	0,95	0,97	0,91

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos é de grande importância na detecção e direcionamento do tratamento da doença em indivíduos com estrongiloidíase (KROLEWIECKI et al., 2013; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2013). Estudos com antígeno de excreção/secreção em outros parasitos intestinais procuram desenvolver e melhorar o diagnóstico destas parasitoses. Desta forma, antígenos obtidos a partir de produtos de excreção e secreção de parasitos são apresentados como ferramentas promissoras no desenvolvimento de diagnósticos sorológicos mais efetivos.

No presente estudo, a produção de antígeno E/S de larvas L3 de *S. venezuelensis* e sua aplicação no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana foi realizada. O antígeno E/S de larvas L3 teve um bom rendimento quanto ao volume obtido em meio RPMI e PBS. A coleta e reabastecimento de meio de cultura a cada 24 h permitiu obter um volume final de antígeno que pôde ser concentrado e utilizado em testes de imunodiagnóstico para proporcionar detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis* em amostras de soro humano. Em outros estudo, utilizando os antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* nos testes de dot-ELISA e ELISA, detectou-se anticorpos específicos contra a parasitose, demonstrando que o antígeno era estável, de bom rendimento em seu volume final, fácil de realizar e de baixo custo (CAMARGO et al., 1992).

Estudos prévios com diferentes espécies do gênero *Strongyloides* observaram tempos de cultivo semelhantes. Em um estudo utilizando larvas L3 de *S. stercoralis* em meio DMEN em uma concentração de 50.000 a 100.000 larvas/mL foi mantida em cultura por períodos de 24 a 48 h. Segundo outros autores, as larvas L3 de *S. stercoralis* em PBS tiveram tempo de cultura de 6 h com concentração a 10.000 larvas/mL (BRINDLEY et al., 1988; EL-BADRY, 2009). Com larvas L3 de *S. ratti*, um estudo manteve culturas durante 24 a 72 horas a uma

concentração de 30.000 larvas/ml de meio RPMI-1640 suplementado com estreptomicina, penicilina e HEPES (SOBLIK et al., 2011). A viabilidade entre os parasitos em cultura pode variar mesmo entre parasitos do mesmo gênero e, principalmente, entre organismos diferentes, por exemplo, larvas L1 de *Trichinella spiralis* sobrevivem 4 a 5 dias enquanto adultos *Heligmosomoides polygrus* permanece em cultura por até 20 dias. O ambiente que estaria presente no sistema nativo está ausente nas culturas e isto pode produzir um efeito sobre o padrão metabólico de excreção e secreção do parasito. Métodos de coleta dos antígenos de E/S dependem do parasito, seu ciclo de vida e como os produtos de excreção e secreção são liberados pelos parasitos (MARCILLA et al., 2012, WHITE, ARTAVANIS-TSAKONAS, 2012).

Quanto à caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes dos antígenos produzidos no estudo, os três antígenos (SE, E/S RPMI e E/S PBS) compartilharam frações proteicas de mesmo peso molecular, enquanto poucas frações proteicas foram particulares de cada antígeno. Acredita-se que essa partilha está relacionada ao fato de que os produtos de excreção e secreção do parasito estão presentes no antígeno SE enquanto a particularidade de algumas frações estão presentes em apenas um antígeno pode estar relacionada ao fato de que o RPMI é um meio enriquecido, ao passo que o PBS não apresenta substâncias orgânicas que possam servir de substrato para as larvas, podendo ocorrer liberação de proteínas diferenciadas.

No teste ELISA, todos os antígenos foram capazes de ser detectados por anticorpos IgG anti-*S. stercoralis*. O antígeno E/S PBS apresentou os melhores resultados, reduzindo o número de falso positivos nos grupos St-, IS- e OP quando comparados aos antígenos SE e RPMI E/S. O antígeno SE mostrou sensibilidade melhorada quando comparado com o antígeno E/S RPMI, mas a reatividade cruzada com SE foi mais evidente demonstrando uma redução da especificidade em relação ao antígeno RPMI E/S. Quando observamos os grupos

St+, St-, IS+ e IS-, eles não apresentaram diferença estatística quando comparados os grupos St+ com IS+ e St- com IS- para todos os antígenos, demonstrando que não houve diferença entre a detecção de IgG anti-*S. stercoralis* quando ocorre uma condição imunossupressora.

Ao analisar a detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* comparando os diferentes antígenos apresentados no estudo, observou-se que o grupo St+ apresentou diferença estatística entre todos os antígenos. O grupo OP apresentou diferença estatística entre o SE com E/S RPM e antígenos E/S PBS. Quanto aos grupos de pacientes imunossuprimidos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os antígenos E/S RPMI e E/S PBS com significância inferior entre o antígeno SE e E/S RPMI.

Em um estudo com pacientes imunossuprimidos, utilizando antígeno bruto e suas outras frações no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana, observou-se que o antígeno bruto apresentava sensibilidade e especificidade relativamente baixa no teste ELISA (SILVA et al., 2014). Comparando-se o extrato salino total e o antígeno alcalino e suas respectivas frações obtidas pelo processo Triton-114, observou-se que os antígenos obtidos pelas frações, em particular, a fração detergente do antígeno salino total foram superiores no diagnóstico em relação ao antígeno total (FELICIANO et al; 2010). Um estudo que procurou detectar IgG anti-*Anisakis simplex* a partir de antígenos excretórios e secretórios de larvas filaroides produzidos em meios RPMI e PBS mostrou que o antígeno produzido em PBS era superior ao antígeno produzido em meio RPMI (HWANG et al., 2003).

Embora não existam relatos na literatura científica a respeito dos antígenos E/S de *S. venezuelensis*, a pesquisa com outras espécies do gênero *Strongyloides* é bem relatada. Pesquisas sobre proteínas excretoras e secretoras de diferentes estádios de vida de *S. ratti*, consideradas geneticamente semelhantes ao *S. stercoralis*, já foram descritas. Estudos com o objetivo de identificar o secretoma e proteoma das diferentes formas evolutivas de *S. ratti* encontraram 586 proteínas diferentes, das quais 193 eram próprias de larvas de terceiro

estádio, que se aplicaram na detecção de anticorpos anti-*S ratti* no soro de ratos infectados apresentaram resultados satisfatórios (SOBLIK et al., 2011).

A resposta imunológica aos helmintos é predominantemente o perfil de Th2. Os produtos excretores e secretores de helmintos podem influenciar a apresentação do antígeno suprimindo a ativação das células de perfil Th1 ou Th17 e apoiando o desenvolvimento de células de perfil Th2. Os produtos de excreção e secreção podem alterar as células dendríticas impedindo receptores específicos tais como CD40, CD80 e CD86, impedindo a síntese de moléculas pró-inflamatórias auxiliando no deslocamento para o perfil Th2 (SALGAME; YAP; GAUSE, 2013). Esta modulação da resposta imune e sua participação direta no desenvolvimento de um perfil de resposta pode explicar a maior especificidade observada nos antígenos E/S em comparação com SE. Estas modulações por estes antígenos podem produzir antígenos específicos com elevada imunogenicidade e antigenicidade sendo interessante a sua utilização devido ao seu reconhecimento que permite um diagnóstico mais específico. O antígeno SE apresenta, supostamente, elevada reatividade cruzada devido a proteínas comuns a outros parasitas que são mantidas durante a evolução dos parasitas ligados à filogenia destes parasitos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os antígenos dos produtos de excreção e secreção de larvas L3 de *S. venezuelensis* são uma alternativa na busca de um diagnóstico sorológico mais específico e sensível para a estrogiloidíase humana.
- ✓ Os antígenos E/S produzidos em meios RPMI e PBS, apresentaram maior eficácia no teste ELISA quanto à especificidade, quando comparados com o antígeno SE comumente utilizado em testes imunológicos.
- ✓ Apenas o antígeno E/S em meio PBS apresentou-se mais sensível que o antígeno já utilizado como opção diagnóstica.
- ✓ A detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* em pacientes com estrogiloidíase e pacientes com condições imunossupressoras utilizando antígenos E/S de larvas de *S. venezuelensis* L3 foi satisfatório.
- ✓ O produto de E/S em meio PBS apresentou maior eficiência diagnóstica, mostrando-se mais sensível e específico que as demais opções de antígenos para o imunodiagnóstico.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, N. W.; KLEIN, D. M.; DORNINK, S. M.; JESPERSEN, D. J.; KUBOFCEK, J.; NUTMAN, T. B.; MERRIGAN, S. D.; COUTURIER, M. R.; THEEL, E. S. Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 21, p. 732-736, 2014.

BAERMANN G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproben. In: Geneesk met H, editor Mededeel. Batavia: Lab. Weltevreden, Feestbundel, p. 41-47, 1917.

BAVAY, A. Sur l'*Anguillule stercorale*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 84, p. 694-696, 1876.

BON, B.; HOUZE, S.; TALABANI, H.; MAGNE, D.; BELKADI, G.; DEVELOUX, M.; SENGHOR, Y.; CHANDENIER, J.; ANCELLE, T.; HENNEQUIN, C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1716-1719, 2010.

BOUNFRATE, D.; FORMENTI, F.; PERANDIN, F.; BISOFFI, Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. 1-10, 2015.

BRINDLEY P.J.; GAM A.A.; PEARCE E.J.; POINDEXTER R.W.; NEVA, F.A. Antigens from the surface and excretions/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.28, p. 171-180, 1988.

CABRAL, A.C.; IÑIGUEZ, A.M; MORENO, T.; BÓIA, M.N.; CARVALHO-COSTA, F.A.
Clinical conditions associated with intestinal strongyloidiasis in Rio de Janeiro, Brazil.
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 48, p. 321-325, 2015.

CAMARGO E.D.; NAKAMURA P.M.; VAZ A.J.; SILVA M.V.; CHIEFFI P.P.; DE MELO E.O. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 55-60, 1992.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; de MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia humana**, 13 ed., São Paulo: Atheneu, p. 313-323, 2016.

COSTA-CRUZ, J. M.; MADALENA, J.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloide sstercoralis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 265-268, 2003.

DE CARLI, G. A.; TASCA, T. *Strongyloides stercoralis*. **Atlas de Diagnóstico em Parasitologia Humana**, São Paulo: Atheneu, p.186, 2014.

EL-BADRY AA. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 39, p. 757-768, 2009.

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

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.

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

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 78–84, 2011.

GREINER M.; SOHR P.; GÖBEL P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunology Methods**, v. 85, p. 123-132, 1995.

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

HAWDON, J. M.; DATU, B. The second messenger cyclic GMP mediates activation in *Ancylostoma caninum* infective larvae. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 787-793, 2003.

HIRATA, T., UCHIMA, N., KISHIMOTO, K., ZAHA, O., KINJO, N., HOKAMA, A., SAKUGAWA, H., KINJO, F., FIJITA, J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 246-249, 2006.

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

HWANG Y.K.; KIM J.S.; LEE J.B.; SONG T.J.; JOO K.W.; LEE J-S, CHO S-W. Human anisakiasis: diversity in antibody response profiles to the changing antigens in larval excretions/secretions. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 1-7, 2003.

IRIEMENAM, N. C.; SANYAOLU, A. O.; OYIBO, W. A.; FAGBENRO-BEYIOKU, A. F.. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. **Parasitology International**, v.59, p. 9-14, 2010.

KEISER, P.; NUTMAN, T. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology**, v. 17, p. 208-217, 2004.

KROLEWICKI, A. J.; LAMMIE, P.; JACOBSON, J.; GABRIELLI, A.-B.; LEVECKE, B.; SOCIAS, E.; ARIAS, L.M.; SOSA, N.; ABRAHAM, D.; CIMINO, R.; CRUDO, F.; VERCRUYSE, J.; ALBONICO, M. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-7, 2013.

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

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, E. R.; CARLOS, D.; LOURENÇO, E. V.; SORGI, C. A.; SILVA, E. V.; RAMOS, S. G.; UETA, M. T.; ARONOFF, D. M.; FACCIONI, L. H. Counterregulation of Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 571–578, 2009.

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONÇALVES-PIRES, M. R. LOUREIRO, Z. M.; ARAÚJO, R. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, p. 154-158, 2008.

MACHADO, E.R.; UETA, M.T.; LOURENÇO, E.V.; ANIBAL, F.F.; SORGI, C.A.; SOARES, E.G.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MEDEIROS, A.I.; FACCIONI, L.H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3892-3899, 2005.

MAIA, T. M. C.; VASCONCELOS, P. R. L.; FAUTH, S.; MOTTA NETO, R. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 19, p. 118-121, 2006.

MAIZELS, R.M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 733-744, 2003.

MARCILLA A.; TRELIS M.; CORTÉS A.; SOTILLO J.; CANTALAPIEDRA F.; MINGUEZ M.T.; VALERO M.L.; SÁNCHEZ DEL PINO M.M.; MUÑOZ-ANTOLI C.; TOLEDO R.; BERNAL D. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. **PLoS One**, v. 7, e45974, 2012.

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

MEJIA, R.; NUTMAN, T.B. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, p. 458-463, 2012.

MERZ, L. Strongyloidiasis: who is at risk of severe infection and how to prevent it? **Revue Médicale Suisse**, v. 11, p. 867-871, 2015.

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: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 273p.

MONTES, M.; SANCHEZ, C.; VERDONK, K.; LAKE, J. E.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G.; TERASHIMA, A.; NOLAN, T.; LEWIS, D. E.; GOTUZZO, E.; WHITE JUNIOR, A.C. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. e456, 2009.

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

NAGARAJ, S. H.; GASSER, R. B.; RANGANATHAN, S. Needles in the EST Haystack: Large-Scale Identification and Analysis of Excretory-Secretory (ES) Proteins in Parasitic Nematodes Using Expressed Sequence Tags (ESTs). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. e301, 2008.

NEVES, D. P. Estrongiloidíase. **Parasitologia Dinâmica**, 3 ed., São Paulo: Atheneu, p. 341-351, 2009.

NEVES, D.P.; MELLO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**, ed. 13, Belo Horizonte: Atheneu, 2016.

NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**, in press, 2016.

ONAH, D.N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p. 209-236, 2000.

PAGE, W.; SPEARE, R. Chronic sstrongyloidiasis- 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.

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.

PIRES, M. L.; DREYER, G. The importance of *Strongyloides stercoralis* revisited. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, p. 175-182, 1993.

PORTO, A. F.; NEVA, F. A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCANTARA, L.; CARVALHO, E. M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 503-507, 2001.

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 Diseases**, v. 7, p. 1-10, 2013.

REY, L. Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 581-590, 2001.

REY, L. Estrongiloidose. In: **Bases da Parasitologia Médica**, 3ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 244-249, 2010.

RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; COSTA, I. N.; GONÇALVES-PIRES M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology Letters**, v. 134, p. 69-74, 2010.

RITCHIE L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin US Army Medical Department Journal**, v. 8, p. 326-334, 1948.

RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CAMPOS, D. M. B.; 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.

ROXBY, A.C.; GOTTLIEB, G.S., LIMAYE. Strongyloidiasis in transplant patients. **Clinical Infection Disease**, v. 49, p. 1411-1423, 2009.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.14, p.5-8, 1954.

SALGAME P.; YAP G.S.; GAUSE W.C. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. **Nature Immunology**, v. 14, p. 1118-1126, 2013.

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: global distribution and riskfactors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-17, 2013.

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

SILVA, H.; CARVALHO, C. J. V.; LAVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. The detergente fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals. **Parasitology International**, v. 63, p. 790–793, 2014.

SOBLIK H.; YOUNIS A.E.; MITREVA M.; RENARD B.Y.; KIRCHNER M.; GEISINGER F.; STEEN H.; BRATTIG N.M. Life cycle stage-resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti* - Identification of stage-specific proteases. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, p. 1-16, 2011.

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

TEIXEIRA, M. C. A.; PACHECO, F. T. F.; SOUZA, J. N.; SILVA, M. L. S.; INÊS, E. J.; SOARES, N. M. Strongyloides stercoralis Infection in Alcoholic Patients. **BioMed Research International**, v. 2016, 11 p., 2016.

TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J. G. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. **Advances in Parasitology**, v. 88, p. 165-241, 2015.

VAIYAVATJAMAI, P.; BOITANO, J.J.; TECHASINTANA, P.; TUNGTRONGCHITR, A. Immunocompromised group differences in the presentation of intestinal strongyloidiasis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 5-8, 2008.

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

VINEY, M.; KIKUCHI, T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* – rodent models of *Strongyloides* infection. **Parasitology**, v.144, p.285-294, 2017.

WHITE R.R.; ARTAVANIS-TSAKONAS K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. **Virulence**, v. 3, p. 668-677, 2012.