

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Anticorpos IgY anti-*Strongyloides venezuelensis*: produção, caracterização e aplicação no imunodiagnóstico da strongiloidíase humana

Lucas Silva de Faria

Uberlândia

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Anticorpos IgY anti-*Strongyloides venezuelensis*: produção, caracterização e aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção do título de Doutor

Lucas Silva de Faria

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia

2017

Ficha Catalográfica



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Lucas Silva de Faria

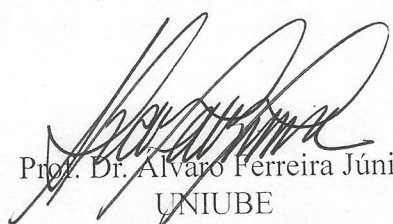
“Anticorpos IgY anti-*Strongyloides venezuelensis*: produção, caracterização e aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana”

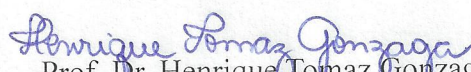
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

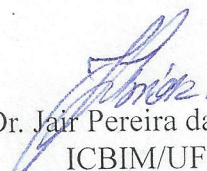
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

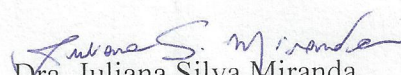
Banca Examinadora:

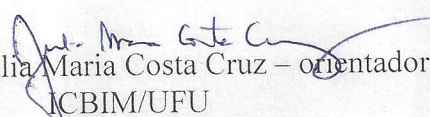
Uberlândia, 13 de novembro de 2017.


Prof. Dr. Alvaro Ferreira Júnior
UNIUBE


Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga
PMU


Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior
ICBIM/UFU


Dra. Juliana Silva Miranda
ICBIM/UFU


Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz – orientadora
ICBIM/UFU

À minha mãe, Maria Rita Silva de Faria, e ao meu pai, Rubens Vieira de Faria, pelo exemplo de honestidade, trabalho árduo e humildade. Diante de todas as dificuldades, a fé deve prevalecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela manutenção da força de vontade, saúde e perseverança durante todos os momentos difíceis. Pela oportunidade de ter convivido em meio a pessoas que me fizeram crescer intelectualmente e moralmente.

À minha família, especialmente ao meu pai Rubens e à minha mãe Maria Rita, pelo exemplo do trabalho e humildade acima de todas as coisas, pela honestidade, união e amor vivenciados durante todos esses anos de vida. E à minha irmã Luíza, pela companhia, amizade e bons momentos durante a infância e adolescência. Muito obrigado por vocês existirem em minha vida.

Aos meus irmãos/amigos pelo companheirismo, por terem feito parte integralmente dos mais de 11 anos vividos em Uberlândia, por terem sido amigos exemplares, irmãos de coração que compartilharam o mesmo teto, o alimento de cada dia, os momentos mais divertidos e as lembranças que ficarão para sempre guardadas em meu coração. Sem vocês nada teria feito sentido e se concretizado para meu amadurecimento.

Aos companheiros de laboratórios, pesquisas, salas de aula, durante toda a Graduação, Mestrado e Doutorado, por todos os momentos compartilhados, sempre repletos de alegria e descontração. Por terem participado ativamente do desenvolvimento de vários trabalhos e pela ajuda amiga nos momentos necessários. Foram tantos e tão importantes em minha vida. Em especial a toda equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses que trilharam comigo o caminho longínquo do Doutorado.

À Profa Dra. Julia Maria Costa Cruz que me recebeu com tanta confiança e plenitude, mesmo eu não tendo a experiência necessária para começar um trabalho tão alheio a minha realidade. Nem mesmo quando tudo parecia tão difícil, sua confiança na minha capacidade não deixou de existir. Pelos bons exemplos de caráter, responsabilidade, fé e positivismo. Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pela coorientação, por todas as ideias, pelas portas abertas e pela intensidade da busca pelos objetivos. Ao Prof. Dr. Júlio Mendes que me iniciou no campo da pesquisa acadêmica durante a Graduação e Mestrado, me deixando valores extremos de honestidade, humildade, dedicação e responsabilidade. Ao Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior pela parceria, amizade, ideais positivos e por despertar em mim o interesse em um novo campo que jamais havia almejado. À Profa. Dra. Élide Mara Rabelo Leite pela cooperação pontual e por ter sido extremamente solícita quando precisei, abrindo as portas do Laboratório de Parasitologia na Universidade Federal de Minas Gerais. À Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela solicitude e contribuição fundamental no momento

do fracionamento dos anticorpos. Foram muitos exemplos a serem seguidos para a atuação como professor e orientador.

Aos membros que estiveram presentes na avaliação do trabalho, pela disposição e contribuição para o melhoramento do mesmo, em especial ao Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior, Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, Dra. Juliana Silva Miranda, Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva e ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior.

Aos companheiros e colegas de trabalho da nova vida em Monte Carmelo, todos os técnicos e professores da Universidade Federal de Uberlândia, que se tornaram amigos e contribuíram efetivamente para a superação das dificuldades por estar distante de Uberlândia na maior parte do tempo de Doutorado. Aos também colegas da Fundação Carmelitana Mário Palmério (FUCAMP), onde pude amadurecer um pouco dos anseios da vida acadêmica como professor. A todos os alunos que me ouviram neste tempo e que despertaram em mim o desejo da preparação, do desenvolvimento, do aprimoramento, do conhecimento e da importância de ser exemplo positivo em suas vidas.

A todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, à CAPES, e às instituições Universidade Federal de Uberlândia, Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade de Uberaba, Fundação Carmelitana Mário Palmério, por terem representado a base necessária para a concretização deste trabalho.

Gratidão a todos que tive a oportunidade de compartilhar momentos nestes 28 anos de história de vida. Foram muitos aprendizados e bons exemplos que me permitiram chegar até aqui, superando todas as dificuldades do caminho com disposição, fé, e com o desejo da melhoria tanto intelectual quanto moral, até quando Deus permitir.

LISTA DE ABREVIACÕES

°C – graus Celsius

% – porcentagem

AAs – adulto de *Ascaris suum*

Abs – absorbância

APS – *ammonium persulfate*/persulfato de amônio

ASC – área sob a curva/*area under curve*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*/Ferramenta básica de busca de alinhamento local)

BLASTp – *Protein BLAST*

BSA – *bovine serum albumin*/soroalbumina bovina

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais

CD4⁺ – marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CEP – Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CH – domínio constante de cadeia pesada da imunoglobulina

cm – centímetro

CP – cadeia pesada de imunoglobulina

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária

Cut-off – limiar de reatividade, ponto absoluto ótimo de corte

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – densidade óptica

EA – extrato antigênico salino total

EDTA – etileno-diamino-tetra-acetato

ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*

ER2738 – *Escherichia coli* cepa ER2738

Es – especificidade

Fab – fragmento ligante de antígeno

F1 – bacteriófago da linhagem F1

Fd – bacteriófago da linhagem M13

FITC – *fluorescein isothiocyanate*/isotiocianato de fluoresceína

Fp – fêmea partenogenética de *Strongyloides venezuelensis*
g - gravidade
GATA-3 – fator de transcrição GATA-3
Gly – glicina
H – teste não paramétrico de Kruskal-Wallis
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
HCl – ácido clorídrico
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HSP60 – *heat shock protein 60*/proteína do choque térmico 60
IA – índice avidéz
IC – intervalo de confiança
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IE – índice ELISA
IgA – imunoglobulina A
IgD – imunoglobulina D
IgE – imunoglobulina E
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M
IgY – imunoglobulina Y
IL – interleucina
iL3 – larva filarioide de *Strongyloides venezuelensis*
INF- γ – interferon γ
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITS – *internal transcribed spacer*
K₂SO₄ – sulfato de potássio
kDa – kilodaltons
kg – quilograma
L1 – larvas rabditoides de primeiro estágio
L2 – larvas rabditoides de segundo estágio
L3 – larvas filarioides infectantes de terceiro estágio
L3Ac – larva filarioide de *Ancylostoma ceylanicum*
L4 – larva de quarto estágio
LB – meio de cultura Luria-Bertani

M – molar

M13 – bacteriófago da linhagem M13

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MHC – *major histocompatibility complex*/Complexo principal de histocompatibilidade

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

mm – milímetro

m/v – massa por volume

N – normal

NaCl – cloreto de sódio

NaI – iodeto de sódio

Na₂HPO₄ – fosfato dissódico

ng – nanograma

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – ortofenilenodiamina

P – nível de significância

P – amostra purificada de IgY em sistema completo de cromatografia com coluna de afinidade tiofílica

P1 – precipitado rico em lipídeos

P2 – precipitado rico em anticorpos IgY

pIII – proteína três do capsídeo do fago M13

pVI – proteína seis do capsídeo do fago M13

pVII – proteína sete do capsídeo do fago M13

pVIII – proteína oito do capsídeo do fago M13

pIX – proteína nove do capsídeo do fago M13

PBS – *phosphate buffered saline*/solução salina tamponada com fosfato

PBS-T – *phosphate buffered saline – tween*/solução salina tamponada com fosfato adicionada de tween 20

PBS-T-M – *phosphate buffered saline – tween – milk*/solução salina tamponada com fosfato adicionada de tween 20 e leite desnatado

PCR – *polymerase chain reaction*/reação em cadeia da polimerase

PEG – polietilenoglicol

pH – potencial hidrogeniônico

Ph.D.-C7C - biblioteca comercial de *Phage display* de 7 aminoácidos de conformação rígida

PM – peso molecular

pmol – picomol

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

ROC – *receiver operating characteristic*/curvas de características de operação do receptor

rpm – rotação por minuto

RR – razão de probabilidades

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal

S1 – fração solúvel rica em proteínas sem o conteúdo lipídico

S2 – sobrenadante descartado após a precipitação de proteínas

scFv – *single-chain variable fragment*

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

Se – sensibilidade

seg – segundo

TA – temperatura ambiente

T-bet – fator de transcrição T-bet

TBS – *Tris buffered solution*/solução tamponada com Tris

TEMED – tetrametiletilenediamino

TG-ROC – *two-graph receiver operating characteristic*/curvas de características de operação do receptor de dois gráficos

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta

Th1 – linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 – linfócito T auxiliar tipo 2

Th17 – linfócito T auxiliar tipo 17

Treg – linfócito T regulador

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

Tris – hidroximetil

Tris-HCl – solução de Tris adicionada de HCl

Tween-20 – polioxietilensorbitano-monolaurato

μ L – microlitro

μ g – micrograma

U – ureia

Ufc – unidade formadora de colônias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UNIUBE – Universidade de Uberaba

USA – *United States of America*/Estados Unidos da América

VH – domínio variável de cadeia pesada da imunoglobulina

VL – domínio variável de cadeia leve da imunoglobulina

X-gal – 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

WHO – *World Health Organization*/Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das etapas metodológicas empregadas no estudo. O trabalho evidencia a produção e purificação de anticorpos IgY anti-*S. venezuelensis*, que foram caracterizados em ensaios ELISA, *Immunoblotting*, RIFI e aplicados no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana. Os anticorpos também foram usados para a seleção de peptídeos ligantes por *phage-display*, para posterior aplicação diagnóstica.....41

Figura 2 - Espécies utilizadas para o preparo dos extratos antigênicos usados nas imunizações das galinhas. **1.** larvas filarioides infectantes de *Strongyloides venezuelensis*; **2.** fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis*; **3.** larvas filarioides infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*; **4.** adultos de *Ascaris suum*.....44

Figura 3 - Processo de fracionamento dos anticorpos IgY. As amostras derivadas da precipitação proteica foram dosadas a 280 nm em espectrofotômetro (UV-Vis Biodrop µLite, Reino Unido); concentradas em sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA) utilizando membrana com corte de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA) e fracionadas por cromatografia de afinidade em sistema completo ÄKTA Prime (GE Healthcare, EUA). A separação das moléculas de IgY foi realizada pela coluna específica HiTrap IgY Purification HP, 5 mL. Após a eluição das frações contendo os anticorpos IgY, elas foram novamente concentradas, dosadas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C.....48

Figura 4 - Estratégias de *biopanning* para a seleção de clones de fagos com peptídeos expressos ligantes das moléculas de IgY fracionadas. A estratégia 1 utilizou os anticorpos IgY anti-iL3, e a estratégia 2 os anticorpos IgY anti-Fp. A seleção negativa aconteceu nas mesmas condições previamente às duas estratégias de seleções positivas. Os clones não ligados nos poços das seleções negativas foram usados na seleção positiva e eluídos de forma competitiva. **iL3** – larva filarioide de *S. venezuelensis*; **Fp** – fêmea partenogênica de *S. venezuelensis*; **L3Ac** – larva filarioides de *A. ceylanicum*; **AA**s – adulto de *A. suum*.....53

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %) dos extratos antigênicos salinos totais utilizados nos protocolos de imunizações das galinhas. P.M. – padrão de peso molecular RECOM BLUE Wide Range Protein Marker (Real Biotech, Taiwan); **iL3** – larvas filarioides de *S. venezuelensis*; **Fp** – fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*; **L3Ac** – larvas filarioides de *A. ceylanicum*; **AAs** – adulto de *A. suum*. kDa – kilodaltons.....60

Figura 6 - Etapas de purificação dos anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos das galinhas imunizadas. **Etapa 1:** Delipidação pela adição de água ultrapura acidificada. **S1** – Fração solúvel rica em proteínas; **P1** – precipitado rico em lipídeos. **Etapa 2:** Precipitação de proteínas com sulfato de amônio 20 % m/v. **S2** – sobrenadante descartado; **P2** – *pellet* rico em anticorpos IgY resultantes da precipitação proteica.....62

Figura 7 - Concentração proteica em mg/mL das amostras de IgY provenientes de gemas, após o processo de precipitação proteica (**P2**) com sulfato de amônio 20 % m/v. A dosagem de proteínas foi realizada em espectrofotômetro (UV-Vis Biodrop µLite, Reino Unido) a 280 nm. *- Imunizações. **iL3** – larvas filarioides de *S. venezuelensis*; **Fp** – fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*; **L3Ac** – larvas filarioides de *A. ceylanicum*; **AAs** – adultos de *A. suum*.....62

Figura 8 - Cromatograma resultante do fracionamento das moléculas de IgY. O pico de eluição das moléculas de IgY eluídas na coluna cromatográfica corresponde às frações/tubos 35 a 50 de 1 mL cada. As amostras correspondentes ao primeiro pico de eluição foram coletadas e utilizadas nas etapas posteriores. O segundo pico de eluição (frações/tubos 55-57) é correspondente a separação de ovoalbumina, que foi posteriormente descartado.....63

Figura 9 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12 %, sob condições redutoras, das etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY. **G** – solução de gemas prévia ao protocolo de fracionamento; **S1** – sobrenadante rico em proteínas; **P1** – precipitado rico em lipídeos; **S2** – sobrenadante descartado após a precipitação proteica; **P2** – *pellet* rico em anticorpos IgY após precipitação com sulfato de amônio 20 % m/v; **P** – frações obtidas após cromatografia de afinidade. São evidenciadas as cadeias pesadas (65 kDa) e leves (22-24kDa) das moléculas de IgY na gema total (G), na fração solúvel S1, precipitado P2 (etapa de purificação das proteínas), e nas amostras purificadas em sistema completo de cromatografia (**P**). P.M. - padrão de peso molecular RECOM BLUE Wide Range Protein Marker, (Real Biotech, Taiwan). kDa – kilodaltons.....64

Figura 10 - Cinética de produção de anticorpos IgY específicos. A produção dos anticorpos foi monitorada por 10 semanas a partir da primeira imunização e avaliada semanalmente em amostras purificadas das gemas e quinzenalmente em amostras de soro em alternância com as semanas das imunizações. Semana 0 – pré-imunização. *- Imunizações. **A1** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (iL3); **A2** – IgY específica a antígenos de fêmea partenogenética de *S. venezuelensis* (Fp); **A3** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *A. ceylanicum* (L3Ac); **A4** – IgY específica a antígenos de adultos de *A. suum* (AAs). Valores positivos quando o Índice ELISA > 1,0 65

Figura 11 - ELISA avides dos anticorpos IgY purificados e tratados com ureia 6 M. Os índices avides (I.A. %) foram calculados para as semanas que apresentaram Índice ELISA > 1,0 no ensaio de cinética de produção de anticorpos específicos. *- Imunizações. **A1** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (iL3); **A2** – IgY específica a antígenos de fêmea partenogenética de *S. venezuelensis* (Fp); **A3** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *A. ceylanicum* (L3Ac); **A4** – IgY específica a antígenos de adultos de *A. suum* (AAs).....66

Figura 12 - *Immunoblotting* evidenciando o reconhecimento de bandas polipeptídicas dos extratos antigênicos de *S. venezuelensis*. **1** – Antígeno de larvas filarioides (iL3) incubados com anticorpos IgY anti-iL3; **2** – Antígeno de fêmeas partenogenéticas (Fp) incubados com anticorpos IgY anti-Fp. P.M. – padrão de peso molecular. A marcação das bandas foi analisada pelo programa computacional Image J 1.48. kDa – kilodaltons 67

Figura 13 - Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando anticorpos IgY purificados em cortes histológicos de *S. venezuelensis* (iL3 – larvas filarioides; Fp – fêmeas partenogênicas) ou controle negativo de marcação (formas metacestodeas de *T. solium*). Coluna **A** (verde): Anti-IgY conjugado com FITC; **B** (vermelho): Contracoloração com azul de Evans; **C** (*merged*): das colunas A com a B.....68

Figura 14 - ELISA sanduíche para a detecção de imunocomplexos utilizando anticorpos IgY específicos (**A.** IgY anti-iL3 ou **B.** IgY anti-Fp) em amostras de soro de pacientes com esrongiloidíase confirmada (n = 45), indivíduos saudáveis (n = 45) e com outras parasitoses (n = 45); **1.** ****- Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,0001$); **2.** *Receiver operating characteristic curves* (curva ROC) indicando, valores de *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC) e razões de probabilidades (RP+ e RP-), intervalo de confiança (IC 95 %).70

Figura 15 - Validação dos clones de fagos selecionados após as duas estratégias de *biopanning* empregadas (**1-** IgY anti-iL3 e **2-** IgY anti-Fp) por *phage*-ELISA. A reatividade de cada clone de fago foi avaliada pela incubação com a IgY alvo. Em destaque (verde) os clones com maiores valores de DO, considerados mais específicos aos respectivos anticorpos IgY. DO – Densidade óptica a 492 nm.....73

Figura 16 - Validação dos clones de fagos selecionados nas duas estratégias de *biopanning* empregadas (**1-** IgY anti-iL3 e **2-** IgY anti-Fp) por *phage*-ELISA para o imunodiagnóstico da esrongiloidíase humana. Foram utilizados *pool* de soros aleatórios dos três grupos de indivíduos: **Positivos** – pacientes com esrongiloidíase confirmada; **Negativos** – indivíduos saudáveis; **Outras Parasitoses** – pacientes portadores de outras doenças parasitárias. Um clone de fago irrelevante (selvagem) foi utilizado nas mesmas condições como controle de especificidade. DO – Densidade óptica a 492 nm.....74

Figura 17 - *Phage*-ELISA para a detecção de anticorpos IgG utilizando clones de fagos expressando peptídeos obtidos na estratégia 1 (IgY anti-iL3) do *biopanning* (**A.** clone C12, **B.** clone D4, **C.** clone F4) em amostras de soro de pacientes com *estrongiloidíase* confirmada (n = 45), indivíduos negativos (n = 45) e com outras parasitoses (n = 45); **1.** ****- Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,0001$), **- $P < 0,001$, *- $P < 0,05$; **2.** *Receiver operating characteristic curves* (curva ROC) indicando, valores de *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC) e razões de probabilidades (RP+ e RP-), intervalo de confiança (IC 95 %) 78

Figura 18 - *Phage*-ELISA para a detecção de anticorpos IgG utilizando clones de fagos expressando peptídeos obtidos na estratégia 2 (IgY anti-Fp) do *biopanning* (**A.** clone E4, **B.** clone E5, **C.** clone F8) em amostras de soro de pacientes com *estrongiloidíase* confirmada (n = 45), indivíduos saudáveis (n = 45) e com outras parasitoses (n = 45); **1.** ****- Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,0001$), **- $P < 0,001$, *- $P < 0,05$; **2.** *Receiver operating characteristic curves* (curva ROC) indicando, valores de *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC) e razões de probabilidades (RP+ e RP-).....79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Período de duração do acompanhamento experimental com as galinhas poedeiras. As atividades de coleta de ovos e de sangue para obtenção de soro começaram uma semana antes da primeira dose de imunização (Semana 0). As coletas de ovos foram realizadas diariamente e agrupados em semanas. As imunizações e coletas de sangue foram realizadas quinzenalmente em semanas alternadas.....46
- Tabela 2** – Títulos de fagos (ufc) fusionados a peptídeos ligantes aos anticorpos IgY específicos ao *S. venezuelensis* (anti-iL3 e anti-Fp) em cada ciclo de seleção do *biopanning* por imunoafinidade. *Os valores de título de saída correspondem ao eluato não amplificado dos ciclos 1, 2 e 3. ufc: unidade formadora de colônias.....72
- Tabela 3** – Sequências de aminoácidos e alinhamento dos peptídeos obtidos após o processo de *biopanning* nas duas estratégias de seleção (1- IgY anti-iL3 e 2- IgY anti-Fp). Os alinhamentos dos peptídeos identificados foram realizados pelo programa Clustal W 2.1.....75
- Tabela 4** – Similaridades entre as sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidos por *phage display* com proteínas de *S. stercoralis*, registradas no GenBank, acessados pelo BLASTp.....76
- Tabela 5** – Reatividade das amostras de soros de pacientes com strongiloidíase confirmada, indivíduos saudáveis e com outras parasitoses em testes *phage*-ELISA, utilizando os clones de fagos selecionados nas estratégias 1 e 2 de *biopanning*, na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*. Amostras foram consideradas positivas quando o IE > 1,0.....80
- Tabela 6** – Comparações entre áreas sob curvas (ASC) dos testes de diagnóstico sorológico utilizando os clones de fagos selecionados nas estratégias 1 e 2 de *biopanning*, na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* específicos por *phage*-ELISA.....81

SUMÁRIO

SUMÁRIO	18
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 – Epidemiologia da estrogiloidíase humana	23
1.2 – Aspectos biológicos de <i>Strongyloides stercoralis</i>	25
1.3 – Patogenia e sintomatologia	27
1.4 – Resposta imune do hospedeiro	28
1.5 – Diagnóstico da estrogiloidíase humana	31
1.6 – <i>Phage-display</i> para seleção de clones de fagos com peptídeos fusionados.....	34
1.7 – Tecnologia IgY	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 – Geral.....	39
2.2 – Específicos	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 - Aspectos éticos	40
3.2 – Amostras de soros humanos	42
3.3 – Obtenção e produção de extratos antigênicos de larvas filarioides e fêmeas partenogênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> , larvas filarioides de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> e adultos de <i>Ascaris suum</i>	42
3.4 – Galinhas poedeiras e imunizações	44
3.5 – Coletas dos ovos e armazenamento das gemas.....	45
3.6 – Fracionamento e purificação dos anticorpos IgY policlonais.....	46
3.7 – Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 12 %)	48
3.8 – Cinética de produção de anticorpos IgY específicos por ELISA indireto	49
3.9 – ELISA avidez.....	50
3.10 – <i>Immunoblotting</i>	50
3.11 – Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	51
3.12 – Anticorpos IgY para a detecção de imunocomplexos em amostras de soros humanos	52
3.13 – <i>Biopanning</i>	52
3.14 – Titulações dos clones de fagos selecionados	55
3.15 – Validação dos clones de fagos selecionados.....	55

3.16 – Extração e sequenciamento de DNA dos clones de fagos	56
3.17 – Análise de bioinformática	57
3.18 – Amplificação e purificação dos clones de fagos mais relevantes	58
3.19 – Aplicação dos clones de fagos selecionados no diagnóstico sorológico da estrongiloidíase por <i>phage</i> -ELISA	58
3.20 - Normas de biossegurança	59
3.21 – Análise estatística	59
4. RESULTADOS.....	60
4.1 – Preparação antigênica	60
4.2 – Acompanhamento das imunizações e obtenção de ovos e soro das galinhas	61
4.3 – Fracionamento dos anticorpos IgY provenientes das gemas	61
4.4 – Caracterização dos anticorpos IgY	64
4.5 – Aplicações dos anticorpos IgY no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana....	69
4.6 – Seleção de fagos com peptídeos fusionados ligantes dos anticorpos IgY produzidos	71
4.7 – Aplicação dos clones de fagos selecionados no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana.....	77
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÃO.....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

RESUMO

Diante da realidade epidemiológica e do negligenciamento da strongiloidíase humana, o diagnóstico rápido e eficaz é uma condição de extrema importância. O desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas é essencial para evitar ou diminuir a manutenção de casos crônicos e hiperinfecções disseminadas no curso desta geohelmintíase. A tecnologia IgY é uma alternativa para a produção de anticorpos policlonais com elevado grau de especificidade e rentabilidade. O objetivo do estudo foi produzir e fracionar anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos de galinhas poedeiras, imunizadas com extratos antigênicos de larvas filarioides infectantes (iL3) e fêmeas partenogenéticas (Fp) de *Strongyloides venezuelensis*. Os anticorpos IgY produzidos foram avaliados no reconhecimento de proteínas parasitárias, cortes histológicos de formas de vida do parasita e no diagnóstico sorológico da strongiloidíase humana. Foram utilizados ainda para a seleção, por *phage-display*, de clones de fagos com peptídeos expressos, ligantes das moléculas de IgY, para aplicação imunodiagnóstica da doença. Cinco imunizações foram realizadas com adjuvantes de Freund em intervalos de 14 dias. Ovos e amostras de soro foram obtidos para monitorar a produção de anticorpos IgY específicos. As gemas dos ovos foram purificadas pelo método de diluição em água, seguidas de precipitação de proteínas com sulfato de amônio e fracionamento em cromatografia de interação tiofílica. O fracionamento e a especificidade dos anticorpos IgY foram confirmados por testes *dot-blot*, eletroforese em gel de poliacrilamida, *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), ELISA avidez, *immunoblotting* e reações de imunofluorescência indireta (RIFI). As aplicações no imunodiagnóstico da strongiloidíase, utilizando amostras de soro de pacientes, foram realizadas pela detecção de imunocomplexos pelos anticorpos IgY em testes ELISA, e pela detecção de IgG circulante pelos clones de fagos com peptídeos fusionados, selecionados em duas estratégias diferentes de *biopanning*, por testes *phage*-ELISA. Bandas polipeptídicas das cadeias pesadas (65 kDa) e leves (22-24 kDa) das moléculas de IgY foram visualizadas em SDS-PAGE 12 %. A especificidade dos anticorpos IgY foi confirmada pelo reconhecimento de bandas proteicas dos extratos antigênicos totais e de estruturas em cortes histológicos de *S. venezuelensis* (iL3 e Fp). Os anticorpos IgY apresentaram índices de avidez variando de 68,0 % a 95,4 %. A detecção de imunocomplexos nas amostras de soros dos pacientes apresentaram valores diagnósticos de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para IgY anti-iL3 e IgY anti-Fp respectivamente: Se: 95,56 % e Es: 88,89 %; Se: 95,56 % e Es: 91,11 %. As estratégias de *biopanning* selecionaram clones de fagos que expressam peptídeos de estruturas similares a proteínas de *Strongyloides stercoralis*, causador da infecção em seres humanos. Foram identificados seis principais clones de fagos, sendo dois (C12 e D4) considerados com melhores valores diagnósticos na detecção de IgG em amostras de soro de pacientes (D4 – Se: 82,2 %, Es: 83,3 %; C12 – Se: 80,0 %, Es: 82,2 %). A tecnologia IgY pode ser considerada uma importante ferramenta no estudo da strongiloidíase humana com possibilidades de aplicação no diagnóstico sorológico e na terapêutica da doença.

Palavras-chave: *Strongyloides stercoralis*, Imunoglobulina Y, imunocomplexos, *phage-display*, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

IgY anti-*Strongyloides venezuelensis*: production, characterization and application in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis.

In view of the epidemiological problem of the neglected condition of human strongyloidiasis, a rapid and effective diagnosis is extremely important. The development of new diagnostic tools is essential to avoid hyperinfections and chronic cases in the course of this geohelminthiasis. IgY technology is an alternative for antibody production with high specificity and profitability. This study aimed to produce and fractionate IgY antibodies from egg yolks of hens immunized with total antigenic extracts of *Strongyloides venezuelensis* infectious filariform larvae (iL3) and parthenogenetic females (pF). The IgY antibodies produced were evaluated by the recognition of parasitic proteins, life forms and serological diagnosis of human strongyloidiasis. They were also used for the selection of phage clones with expressed peptides binding of the IgY molecules by phage display, for immunodiagnostic application of the disease. Five immunizations were performed with Freund's adjuvants at 14-day interval. Eggs and serum samples were obtained to monitor the production of specific antibodies. Egg yolks were purified by water dilution method and protein precipitation by ammonium sulfate, followed by fractionation in tiophilic interaction chromatography. The fractionation and antibodies specificity were confirmed by dot-blot, electrophoresis, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), ELISA avidity, immunoblotting and immunofluorescence antibody test (IFAT). Applications in the immunodiagnostic of strongyloidiasis, using human serum samples, were performed by detection of immune complexes with IgY antibodies by ELISA, and by detection of circulating IgG, with peptide-fused clones selected in two different biopanning strategies, by phage-ELISA. Proteins from heavy (65kDa) and light (22-24kDa) chains of IgY molecules were visualized on 12 % SDS-PAGE. The specificity was confirmed by recognition of protein bands from the total extracts and by IFAT in histological sections of *S. venezuelensis* (iL3 and pF). Antibodies showed levels of avidity ranging from 68.0 % to 95.4 %. The detection of immune complexes in serum samples showed diagnostic values of sensitivity (Se) and specificity (Sp) for anti-iL3 IgY and anti-Fp IgY antibodies respectively: Se: 95.56 % and Sp: 88.89 %; Se: 95.56 % and Sp: 91.11 %. Biopanning strategies selected phage clones fused-peptides with structures similar to *Strongyloides stercoralis* proteins, which caused the infection in humans. Six main phage clones were identified, being two (C12 and D4) considered with the best diagnostic values for IgG detection in human serum samples (D4 - Se: 82.2 %, Sp: 83.3 %, C12 - Se: 80.0 %, Sp: 82.2 %). IgY technology can be an important tool for the strongyloidiasis study with possibilities for application in disease therapeutics and as a serological diagnostic method.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*; Immunoglobulin Y; immune complexes; phage-display; immunodiagnostic.

1. INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase ou anguilulose é uma helmintíase causada por parasitos nematoides pertencentes ao gênero *Strongyloides*. Este gênero apresenta mais de 50 espécies descritas, com classificação biológica pertencente ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe Chromadorea, subclasse Chromadoria, ordem Rhabditida, superfamília Strongyloidea e família Strongylidae (DE LEY; BLAXTER, 2002). Todas as espécies são consideradas parasitas gastrointestinais obrigatórias, com capacidade de infectar o ser humano, outros mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Dentre os membros do gênero, destacam-se as espécies *Strongyloides stercoralis* Bavay, 1876 e *Strongyloides fuelleborni* Grassi, 1879 como infectantes ao homem (SPEARE, 1989; GROVE, 1996; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; VINEY; LOK, 2015).

Strongyloides stercoralis é a espécie mais comum e a que representa maior importância clínica nos casos de estrogiloidíase humana. Apresenta ampla distribuição geográfica, havendo predominância em áreas tropicais e subtropicais, de modo que o risco de infecção está ligado diretamente às condições de higiene do indivíduo. O helminto pode induzir a fase crônica da doença com o estabelecimento de um ciclo de autoinfecção (WU *et al.*, 2012; AZIRA; ABDEL RAHMAN; ZEEHAIDA, 2013; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). A espécie *S. fuelleborni* causa a estrogiloidíase principalmente na África, Filipinas e em ilhas de Nova Guiné (PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996).

A estrogiloidíase é uma geohelmintíase considerada negligenciada pelo grande número de indivíduos expostos, infecções subclínicas não diagnosticadas e devidamente tratadas e pela associação com áreas de desvantagens sociais, baixa infraestrutura e saneamento básico insipiente (OLSEN *et al.*, 2009; BISOFFI *et al.*, 2013; O'CONNELL; NUTMAN, 2016; BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016; JOURDAN *et al.*, 2017; WHO, 2017). Outro fator preponderante para a subestimação desta parasitose é a dificuldade no diagnóstico parasitológico, principalmente pela liberação pequena e irregular de larvas nas fezes dos pacientes. Os fatores citados contribuem diretamente para o desenvolvimento de casos crônicos da doença e pela continuidade do ciclo parasitário cosmopolita (SCHÄR *et al.*, 2013; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). O desenvolvimento de infecções graves e letais é outra característica importante desta infecção parasitária em pacientes expostos a diversos fatores imunossupressores (DE BONA; BASSO, 2008; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; PAGE; SPEARE, 2016).

Em modelos experimentais é comum a utilização de outras espécies do gênero *Strongyloides* para o estudo da infecção humana. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 e *Strongyloides ratti* Sandground, 1925 são as espécies mais utilizadas em roedores, permitindo o desenvolvimento de estudos de biologia molecular, interação parasito hospedeiro, ensaios terapêuticos e para a obtenção de antígenos heterólogos para a padronização de técnicas de imunodiagnóstico (MACHADO *et al.*, 2003; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; COSTA-CRUZ, 2011; GONZAGA *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2017).

Diante da magnitude da estrongiloidíase e da importância do diagnóstico rápido e eficaz, a fim de se evitar os casos crônicos e as hiperinfecções, é de fundamental importância o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas que possam ser aplicadas no estudo da doença, principalmente no imunodiagnóstico e terapêutica (BISOFFI *et al.*, 2013; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

A tecnologia IgY consiste na produção de anticorpos policlonais, provenientes de aves imunizadas contra diversos alvos antigênicos. Esses anticorpos podem ser obtidos das gemas e do soro de galinhas poedeiras e são caracterizados pelo alto rendimento, especificidade e pelas diversas possibilidades de aplicações. Uma única galinha pode produzir 300 ovos/ano, cada ovo com 10 mL de gema. Para cada mL de gema podem ser obtidos de 4 a 10 mg de anticorpos após os processos de purificação. Uma série de estudos demonstrou a utilização desses anticorpos em plataformas diagnósticas, imunizações passivas contra doenças infecciosas humanas e de interesse veterinário e como ferramenta experimental em vários testes laboratoriais (SCHWARZKOPF *et al.*, 2001; PAULY *et al.*, 2009; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

1.1 – Epidemiologia da estrongiloidíase humana

A estrongiloidíase é uma parasitose com distribuição mundial heterogênea, considerada endêmica nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais, como temperatura e umidade, são favoráveis ao desenvolvimento do parasita. Entretanto encontra-se presente em países de clima temperado como os Estados Unidos e do sul europeu (REY, 2008; CORTI *et al.*, 2011; BUONFRATE *et al.*, 2012). Estima-se que a doença acometa cerca de 30 a 100 milhões de pessoas em 70 países (KOSUBSKY; ARCHELLI, 2004; SCHÄR *et al.*, 2013; VINEY; LOK, 2015). Esses valores, considerados subestimados e em constante aumento, colocam a estrongiloidíase entre as seis geohelmintíases mais

importantes. Subestimação essa que é motivada principalmente pela complexidade do ciclo parasitário da espécie, baixa sensibilidade dos métodos de diagnósticos empregados e pela atenção deficitária de políticas públicas e de agências financiadoras em estudos e programas de controle (BISOFFI *et al.*, 2013; CIMINO; KROLEWIECKI, 2014; PUTHIYAKUNNON *et al.*, 2014).

As regiões mundiais são classificadas de acordo com a prevalência da estrogiloidíase, em esporádicas ($< 1\%$), endêmicas ($1-5\%$) e hiperendêmicas ($> 5\%$) (STUERCHLER *apud* PIRES; DREYER, 1993). As áreas hiperendêmicas são localizadas, principalmente, na zona intertropical, concentradas em países em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana, como Brasil, Colômbia, Peru, Costa Rica, Zaire e República Central Africana (FARDET *et al.*, 2007; COSTA-CRUZ, 2011; DEVI; BORKAKOTY; MAHANTA, 2011; CIMINO; KROLEWIECKI, 2014). Nos países desenvolvidos, concentrados principalmente em zona temperada, as infecções são mais frequentes em trabalhadores rurais, imigrantes e viajantes que visitam áreas endêmicas (MARCOS *et al.*, 2008; MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010; COSTA-CRUZ, 2011).

O Brasil apresenta áreas endêmicas e hiperendêmicas para a estrogiloidíase, com grande relevância para a saúde pública. O estudo realizado por Paula e Costa-Cruz (2011) apresentou taxas de prevalência variando de $3,9\%$ a $7,9\%$. O estudo de revisão, avaliando 43 trabalhos epidemiológicos por modelagem matemática, revelou a taxa de prevalência de 13% na população em geral e 17% em âmbito hospitalar (SCHÄR *et al.*, 2013). As maiores prevalências estão concentradas principalmente nos estados de Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). A região de Uberlândia, Minas Gerais, apresenta característica hiperendêmica na prevalência da doença, comprovada por estudos que utilizaram os métodos coprodiagnósticos postulados por Baermann-Moraes (1917; 1948) e Hoffman-Pons e Janer (1934). Os resultados apontaram prevalência de 13% em escolares (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998), $3,3\%$ em crianças hospitalizadas (PAULA *et al.*, 2000), $33,3\%$ em alcoólatras (OLIVEIRA *et al.*, 2002), 12% em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SILVA *et al.*, 2005), $3,8\%$ em diabéticos (MENDONÇA *et al.*, 2006), $9,1\%$ em pacientes com câncer gastrointestinal (MACHADO *et al.*, 2008), $4,4\%$ em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA *et al.*, 2009) e 5% em idosos (NAVES; COSTA-CRUZ, 2013).

1.2 – Aspectos biológicos de *Strongyloides stercoralis*

Os membros do gênero *Strongyloides* possuem seis formas evolutivas com características morfológicas distintas: fêmeas partenogenéticas parasitas, fêmeas e machos de vida livre, ovos, larvas rabditoídes e filariídes (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

As fêmeas partenogenéticas parasitas de *S. stercoralis* possuem corpo cilíndrico com aspecto filiforme, com a extremidade posterior afilada e a anterior arredondada. Medem de 1,7 a 2,5 mm de comprimento por 0,03 a 0,04 mm de largura. Apresentam revestimento corpóreo formado por uma fina cutícula, com estrias transversais. O aparelho digestório é formado por boca trilabiada, esôfago filariforme e alongado, intestino simples e orifício anal na extremidade posterior em posição transversal. A vulva se localiza na região ventral, posicionada no terço médio do corpo. Segue para o útero anfidelfo, ovários e ovidutos, com ovos dispostos enfileirados em diferentes estágios de maturação. O sistema reprodutor ocupa até 2/3 do organismo da fêmea partenogenética (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

As fêmeas de vida livre ou estecorais são fusiformes, possuem cutícula delgada e translúcida, com estrias transversais. Possuem 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 boca é pequena com lábios inconspícuos. O sistema digestório é simples, com esôfago curto e rabditoíde. O ânus é localizado próximo à extremidade posterior. O aparelho genital é composto pela vulva, úteros anfidelfos, ovários e receptáculo seminal. A vulva está localizada na região mediana do corpo, com dois lábios conspícuos. O oviduto está ligado aos ovários, no sentido contrário aos úteros. A produção de ovos é maior em relação às fêmeas partenogenéticas (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2008; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

Os machos de vida livre possuem corpo cilíndrico e fusiforme, com extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente. Possuem revestimento corpóreo similar ao das fêmeas. Medem aproximadamente de 0,7 a 0,9 mm de comprimento por 0,04 mm de largura. O sistema digestório é composto por uma boca trilabiada, esôfago rabditoíde e intestino simples terminando em uma cloaca, localizada na extremidade da região posterior. O sistema reprodutor é composto pelos testículos que ocupam grande parte do corpo, seguidos da vesícula seminal, canais deferente e ejaculador, abrindo em uma cloaca rodeada por dois espículos copulatórios que se deslocam sustentados por uma estrutura

quitinizada, denominada gubernáculo (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

As larvas rabditoides (L1 e L2) são encontradas nas fezes ou em fluidos intestinais. Medem cerca de 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de largura. A porção anterior é cilíndrica, afilando gradualmente até a ponta. A cutícula que recobre o corpo é delgada e hialina. O sistema digestório é composto por uma boca pequena, o esôfago é rabditoide, com dilatações bulbiformes nas extremidades e constrição na parte mediana. O intestino termina em uma abertura anal espaçada da extremidade posterior. As larvas possuem um primórdio genital localizado pouco atrás do meio do corpo, formado por um aglomerado de células (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2008; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

As larvas filarioides (L3) são as responsáveis pela infecção. São alongadas e finas e medem de 0,35 a 0,5 mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de largura. Apresentam cutícula fina e estriada e a cauda com detalhe entalhado característico. O esôfago é filarioide ocupando quase metade do comprimento do nematoide. O intestino é longo e estreito terminado em uma abertura anal (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

Os ovos das fêmeas partenogênicas e das fêmeas de vida livre se assemelham, com diferença apenas no tamanho, sendo os das últimas maiores. Possuem forma elíptica, parede fina e transparente, muito parecidos com os dos ancilostomídeos (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; COSTA-CRUZ, 2011).

Os membros do gênero *Strongyloides* são capazes de realizar um duplo ciclo evolutivo. Dessa forma, apresentam duas gerações, uma de vida livre que ocorre no meio ambiente, com dimorfismo sexual, e outra parasitária, dentro do hospedeiro, representada por fêmeas partenogênicas (MORAES, 1948; VINEY; LOK, 2015). Considerando as infecções por *S. stercoralis*, após a instalação das fêmeas partenogênicas na mucosa intestinal, ocorre a liberação de cerca de 30 a 40 ovos por dia, produzindo simultaneamente três tipos de ovos com características genéticas diferentes. Os ovos maturam ainda dentro do hospedeiro, onde as larvas rabditoides eclodem, podendo se transformar em larvas filarioides infectantes ou fêmeas e machos de vida livre (SHIWAKU *et al.*, 1988; COSTA-CRUZ, 2011; VINEY; LOK, 2015).

As larvas rabditoides são eliminadas nas fezes do indivíduo infectado e podem seguir dois ciclos diferentes. O primeiro é chamado de partenogênico ou direto, no qual as larvas rabditoides no meio externo desenvolvem-se em larvas filarioides infectantes. O segundo é chamado de vida livre ou indireto, no qual as larvas rabditoides desenvolvem-se em fêmeas e

machos de vida livre, respectivamente. Os adultos vivem livremente no solo e por meio da reprodução sexuada formam novas larvas rabditoides que se diferenciam em larvas filarioides infectantes (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2011).

A transmissão da doença ocorre principalmente pela penetração ativa das larvas filarioides (L3) na pele e mucosas do hospedeiro. Logo após, elas alcançam os vasos sanguíneos ou linfáticos e migram para os pulmões. Nos capilares pulmonares diferenciam-se em (L4) e migram pela árvore brônquica até a faringe. As larvas são expectoradas, pelo reflexo da tosse que promovem, ou deglutidas. Após serem ingeridas chegam ao intestino delgado, adquirindo a maturação final em fêmeas partenogenéticas (fase adulta). Assim que atingem a maturidade, iniciam a oviposição. Os ovos eclodem antes da eliminação das fezes, liberando larvas no estágio (L1), que migram para o intestino grosso transformando-se em (L2) e então são eliminadas pelas fezes (GENTA, 1992; PORTO *et al.*, 2002; MEJIA; NUTMAN, 2012; VINEY; LOK, 2015).

A infecção também pode ocorrer pela autoinfecção externa ou exógena, em que as larvas rabditoides presentes na região perianal dos indivíduos infectados, diferenciam-se em larvas filarioides e aí penetram, completando o ciclo direto. Outro mecanismo é a autoinfecção interna ou endógena, na qual as larvas rabditoides situadas na luz intestinal de indivíduos infectados diferenciam-se em larvas filarioides. Esta forma pode provocar infecções crônicas e duradouras, podendo persistir por meses ou anos. Caso não haja tratamento, as seguintes autoinfecções resultam em aumento exagerado de parasitos em múltiplos órgãos, podendo ser fatais para o hospedeiro (LIU; WELLER, 1993; GROVE, 1996; VINEY; LOK, 2015).

1.3 – Patogenia e sintomatologia

O curso da infecção por *S. stercoralis* é geralmente auto-limitado e de baixa morbidade na maioria dos pacientes imunocompetentes. Entretanto pode evoluir para quadros graves de hiperinfecções e levar ao óbito em pacientes imunossuprimidos, diabéticos, portadores da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), alcoólatras crônicos e com infecções parasitárias e bacterianas associadas (SUDRÉ *et al.*, 2006; COSTA-CRUZ, 2011; MOGHADDASSANI *et al.*, 2011; BUONFRATE *et al.*, 2013; WEATHERHEAD; MEJIA, 2014). Dessa forma, os pacientes podem evoluir para a erradicação da doença, para a cronicidade decorrente da autoinfecção, podendo durar longos períodos e por fim, para as

complicações decorrentes das hiperinfecções e disseminações (GENTA, 1992; GROVE, 1996; MARCOS *et al.*, 2008; COSTA-CRUZ, 2011).

A grande maioria dos indivíduos infectados por *S. stercoralis* são assintomáticos ou apresentam sintomas clínicos brandos (SEGARRA-NEWNHAM, 2007). As manifestações clínicas da doença estão relacionadas com a penetração do parasito no hospedeiro, migração durante o ciclo pulmonar e com sua permanência e multiplicação na mucosa intestinal ou em localizações ectópicas. As manifestações cutâneas, secundárias à penetração das larvas na pele, podem passar despercebidas, como provocar pontos eritrematosos, acompanhados de prurido. A migração das larvas pode provocar também manifestações pulmonares, como tosse seca, dispneia ou broncoespasmo e edema pulmonar (Síndrome de Löefler). As complicações gastrointestinais são as mais frequentes e importantes, caracterizadas principalmente por dores abdominais, vômito, emagrecimento, náuseas e surtos de diarreia, seguidos por períodos de obstipação (LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2011).

A sintomatologia da estrogiloidíase é fortemente associada com as condições do hospedeiro e à carga parasitária. Nos casos que envolvem o desequilíbrio imunitário e nutricional dos pacientes, que ocasionam as infecções graves (hiperinfecção e disseminação), os sintomas cutâneos, pulmonares e gastrointestinais são agravados. Pode ocorrer o desenvolvimento de exantemas petequiais e púrpuricos na pele. Nos pulmões, podem ocorrer focos múltiplos de consolidação pneumônica, edemas e abundância na produção de secreções. As lesões intestinais podem evoluir para pontos hemorrágicos, ulcerações e inflamação catarral, ocasionando a liberação de fezes mucosanguinolentas, síndrome da má absorção, obstruções intestinais e atrofia da mucosa. Esses parasitos podem se disseminar para outros órgãos como o fígado, vesícula biliar, rins, linfonodos, coração e sistema nervoso central. E assim, transportando bactérias para os tecidos infectados, provocando quadros de sepse, que são frequentemente fatais, pela rápida evolução e diagnóstico tardio (KEISER; NUTMAN, 2004; DE BONA; BASSO, 2008; REY, 2008; VAIYAVATJAMAI *et al.*, 2008; HOCHBERG *et al.*, 2011).

1.4 – Resposta imune do hospedeiro

Os mecanismos de resposta imunológica e de imunidade protetora da infecção em humanos não são completamente elucidados, devido, principalmente, a complexidade do ciclo parasitário e da interação com o hospedeiro. A maior parte do conhecimento sobre a

imunidade na estrongiloidíase foi obtida em modelos experimentais utilizando animais (BRELOER; ABRAHAM, 2017; NUTMAN, 2017).

A resposta imunológica frente aos helmintos é caracterizada pela modulação tanto da resposta imune inata e adaptativa, bem como as respostas celular e humoral. Nos modelos experimentais com roedores e em estudos com humanos foram evidenciados a tendência ao direcionamento imune dependente de linfócitos T CD4⁺, com perfil de resposta Th2, e mecanismos reguladores (Treg), e o contrário, com a redução na expressão das moléculas pró-inflamatórias dos perfis Th1 e Th17 (MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006; ALLEN; MAIZELS, 2011; GIRGIS; GUNDRA; LOKE, 2013; GRENCIS, 2015). Recentemente, Anuradha *et al.* (2015) constataram que indivíduos com estrongiloidíase apresentavam menores índices de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β e maiores índices de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL10, IL-13, IL-27, IL-37 e TGF- β , quando comparados a pacientes saudáveis. Após o tratamento quimioterápico de pacientes infectados, uma mudança do repertório de citocinas foi evidenciada, com o aumento das citocinas pró-inflamatórias e diminuição dos níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-27, IL-37 e TGF- β . Essa observação comprova o direcionamento de resposta imune para o perfil Th2 e Treg dos indivíduos acometidos pela helmintíase. Resultados contrastantes foram observados pelo desenvolvimento de células Th com perfil híbrido de respostas Th1/2, tanto em modelo murinho, quanto em seres humanos com estrongiloidíase e outras helmintíases. Esses linfócitos auxiliares de perfil híbrido coexpressam os fatores de transcrição T-bet e GATA-3 e produzem, simultaneamente, as citocinas IFN- γ , IL-12 e IL-4 (PEINE *et al.*, 2013; BOCK *et al.*, 2017). O perfil híbrido nesse caso se desenvolve em paralelo ao perfil clássico do tipo Th2. Essas características híbridas de perfil imune se mantêm estáveis por longo tempo e sugerem uma redução imunopatológica, quando comparadas aos perfis Th1 ou Th2 isolados e para um equilíbrio autolimitante da resposta imune durante as infecções helmínticas. Os mecanismos de diferenciação dessa população de células T de perfil Th1/2 ainda não estão elucidados (PEINE *et al.*, 2013; BOCK *et al.*, 2017). Esse perfil híbrido foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ a níveis semelhantes às células do perfil Th1, podendo desempenhar um papel importante na imunidade contra bactérias que se disseminam nos tecidos danificados pelo parasita (BOCK *et al.*, 2017).

O desenvolvimento da imunidade adaptativa é evidenciado quando os antígenos do parasita são apresentados aos linfócitos T CD4⁺, via complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC classe II) (HIRATA *et al.*, 2006). Dessa forma, são produzidas interleucinas (IL) específicas desta via de sinalização como: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e

IL-13, ambas envolvidas na sinalização celular. Assim, ocorre a indução de resposta humoral caracterizada pela produção de imunoglobulinas de classe E (IgE) e A (IgA); e de resposta celular com a ativação de basófilos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, com a finalidade de destruição das larvas e parasitos adultos (GENTA, 1996; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006; MARCOS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013, WEATHERHEAD; MEJIA, 2014). O aumento dos níveis de IgE em pacientes infectados proporciona a degranulação dos mastócitos, liberando citocinas e histamina, influenciando a migração de eosinófilos (MUKAI *et al.*, 2017). A produção de IgA está associada com a imunidade de mucosas, sendo a imunoglobulina mais prevalente nessas superfícies e em secreções como saliva, colostro e líquido. Desempenha papel importante na resposta imune durante a migração do parasito pelas mucosas intestinal e pulmonar (ATKINS *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2003; MOTA-FERREIRA *et al.*, 2009; RIBEIRO; MANHANI; COSTA-CRUZ, 2010; COSTA-CRUZ, 2011). Além da produção de IgE e IgA, os pacientes humanos produzem anticorpos das classes IgM e IgG. A IgG é a principal imunoglobulina do soro, representando de 70-75 % do total de anticorpos séricos. Na resposta contra *S. stercoralis* são formadas imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG4 (ATKINS *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2007). Acredita-se que IgG1 tenha um papel protetor contra a infecção e que IgG4 esteja envolvida no bloqueio da resposta protetora promovida pela IgE, reduzindo a expulsão dos parasitos (ATKINS *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2007). Em pacientes imunocompetentes que apresentam a doença são detectados níveis elevados de IgE, indicando proteção, enquanto pacientes imunocomprometidos apresentam níveis elevados de IgG4 e os níveis de IgE total apresentam-se normais (DE BONA; BASSO, 2008). A resposta promovida pela IgM está associada a primo-infecção, sendo detectada logo após a primeira semana pós-infecção (COSTA-CRUZ, 2011). Pacientes com quadros clínicos graves podem apresentar redução dos níveis de IgM, IgA e IgG e níveis normais de IgE, principalmente em casos de hiperinfecção, disseminação e de imunossupressão (MARCOS *et al.*, 2008; COSTA-CRUZ, 2011). Os mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, por meio da ligação de anticorpos IgE, IgG e IgA, são de grande importância no recrutamento e ativação de eosinófilos e mastócitos, para a eliminação das larvas. Mas também contribui com a ativação do sistema complemento em suas vias clássica e alternativa. Uma das estratégias de evasão do parasito é a secreção de proteases que clivam as moléculas do sistema complemento (MESSIAS; GENTA; MOHREN, 1994; ABBAS; LICHMAN; PILLAI, 2010; COSTA-CRUZ, 2011).

O mecanismo T-independente ocorre com a produção de citocinas e mediadores da inflamação antígeno-inespecíficos pelos macrófagos. Dentre estas citocinas destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1), que atuam nas células caliciformes do intestino estimulando sua proliferação, e consequente produção de muco. O muco secretado na luz intestinal reveste as fêmeas, prevenindo o seu estabelecimento na mucosa ou expulsando-as. Dessa forma as proteínas do muco gastrointestinal, chamadas de mucinas, representam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra helmintos (MARUYAMA *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2005).

1.5 – Diagnóstico da estrogiloidíase humana

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é dificultado pela ausência de sintomas na maioria dos pacientes infectados. Os sintomas quando presentes, como as manifestações pulmonares e gastrointestinais, podem ser confundidos com os de outras parasitoses. Dessa forma, para a confirmação do diagnóstico, é imprescindível a realização de exames parasitológicos ou diretos, para a identificação das diferentes formas evolutivas do parasita. Também podem ser utilizados métodos indiretos, como os testes imunológicos e moleculares complementares, que detectam principalmente anticorpos contra antígenos específicos do parasita ou amplificam sequências gênicas do parasita em amostras fecais (LIU; WELLER, 1993; COSTA-CRUZ, 2011; BISOFFI *et al.*, 2014; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014).

Os exames parasitológicos para o diagnóstico definitivo da estrogiloidíase visam a identificação de larvas em amostras fecais. Dentre os testes mais comuns com esta finalidade destacam-se o método de sedimentação espontânea (HOFFMANN; PONS e JANER, 1934), método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), cultura em placa de ágar (KOGA *et al.*, 1991; STEINMANN *et al.*, 2007) e método de Harada-Mori (HARADA; MORI, 1955). São métodos que podem apresentar baixa sensibilidade, devido à liberação pequena e irregular de larvas nas fezes (SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDRÉ *et al.*, 2006; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014). Considerando os métodos parasitológicos, os melhores resultados de diagnóstico vêm sendo encontrados pelo método de Baermann-Moraes, que se baseia no termo e hidrotropismo das larvas, concentrando-as em um pequeno volume de amostra, posteriormente centrifugada; além das técnicas de cultura das larvas em amostras fecais, permitindo a ocorrência de mudas, como em placas de ágar ou em papel de filtro (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948; HARADA;

MORI, 1955; KOGA *et al.*, 1991; STEINMANN *et al.*, 2007; INÊS *et al.*, 2011). Menos rotineiramente, os parasitos podem ser encontrados em fluidos de aspirado duodenal, lavado brônquico, escarro, urina, esfregaço de sangue periférico, líquido ou em amostras de tecido sólido, como em biópsias de pele e endoscopia do sistema digestório (LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; SUDRÉ *et al.*, 2006; COSTA-CRUZ, 2011; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014). Um dos fatores agravantes para a baixa sensibilidade dos testes coprológicos é a quantidade de amostras fecais frescas necessárias. O ideal de sete amostras colhidas em dias alternados muitas vezes gera constrangimento aos pacientes e para os médicos em solicitá-los, gerando dificuldade na adesão ao protocolo de coleta de amostras fecais por parte dos pacientes (SIDDIQUI; BERK, 2001; HIRA *et al.*, 2004).

Além dos métodos parasitológicos diretos, podem ser utilizados os métodos moleculares e indiretos como hemograma, diagnóstico por imagem e principalmente os métodos imunológicos, que auxiliam no diagnóstico em casos de suspeitas clínicas. São importantes, pois apresentam sensibilidade superior aos métodos parasitológicos, podem fornecer dados sobre a resposta imunológica do hospedeiro e ser úteis em inquéritos soropidemiológicos (SIDDIQUI; BERK, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014; NABEYA *et al.*, 2017).

O diagnóstico molecular é baseado na identificação e amplificação do material genético do parasito em amostras biológicas dos pacientes. A principal ferramenta utilizada nesses casos é a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) (VERWEIJ *et al.*, 2009; LOK, 2014; SAUGAR *et al.*, 2015; O'CONNELL; NUTMAN, 2016; PAULA *et al.*, 2016). As sequências gênicas foram analisadas principalmente em amostras fecais de pacientes como as regiões *internal transcribed spacer* 1 e 2 (ITS 1 e ITS 2) do gene de rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*) (NILFOROUSHAN *et al.*, 2007; MOGHADDASSANI *et al.*, 2011), a região 18S do gene de rRNA (VERWEIJ *et al.*, 2009), o gene da *cytochrome c oxidase, subunit 1* (VERWEIJ *et al.*, 2009; SHARIFDINI *et al.*, 2015), e a sequência repetida AYO28262 *Strongyloides*-específica, recentemente detectada em amostras de urina de pacientes (LODH *et al.*, 2016). O diagnóstico molecular por meio da técnica de PCR não está disponível em todos os centros de diagnóstico, e no momento, é aplicável apenas em situações de pesquisa (MEJIA; NUTMAN, 2012).

Dentre os testes imunológicos destaca-se o método imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) como ferramenta de elevada aplicabilidade, praticidade e sensibilidade no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias (COSTA-CRUZ *et al.*,

1997; SUDRÉ *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007). Caracteriza-se por detectar as interações entre antígeno-anticorpo, podendo os alvos de identificação ser anticorpos específicos, antígenos parasitários ou até mesmo a formação de imunocomplexos, em diversas amostras biológicas, como soro, saliva, lavado broncoalveolar e fezes (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; SUDRÉ *et al.*, 2006). A ocorrência de casos de reatividade cruzada se torna a principal limitação desse método, motivando assim a busca por técnicas de produção antigênica e de anticorpos com elevada especificidade. Utilizando o mesmo princípio que o teste ELISA, mas em aparatos diferentes, o método de *Immunoblotting* também é considerado altamente sensível e específico no reconhecimento de complexos proteicos parasitários. As reações de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando cortes histológicos de formas evolutivas dos parasitos apresentam elevados valores de sensibilidade e especificidade (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; SUDRÉ *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; VAN DOORN *et al.*, 2007; RIGO *et al.*, 2008; MOTA-FERREIRA *et al.*, 2009; FELICIANO *et al.*, 2010; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014; BOSQUI *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017).

A obtenção da quantidade necessária de larvas filarioides de *S. stercoralis* para a produção de extratos antigênicos a serem utilizados nos métodos imunológicos, é de grande dificuldade. Dessa forma, tornou-se conveniente a utilização de antígenos heterólogos provenientes das espécies *S. venezuelensis* e *S. ratti*, que se mostraram compatíveis em relação à composição antigênica (COSTA-CRUZ *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2001). Diversas técnicas para o preparo antigênico foram previamente estudadas, utilizando principalmente larvas filarioides, e em menor número, fêmeas partenogenéticas e ovos de *S. venezuelensis*. Destacam-se as frações hidrofóbicas obtidas com Triton X-114 (FELICIANO *et al.*, 2010); extratos alcalinos totais (GONÇALVES *et al.*, 2012b), frações solubilizadas e de membrana obtidas com detergentes (CORRAL *et al.*, 2015), cromatografia de afinidade (GONZAGA *et al.*, 2011) e de troca iônica (GONZAGA *et al.*, 2013); proteínas recombinantes (RAMANATHAN *et al.*, 2008), peptídeos recombinantes expressos em bacteriófagos (FELICIANO *et al.*, 2014), peptídeos recombinantes sintéticos separados das partículas virais (FELICIANO *et al.*, 2016) e produtos de excreção e secreção (CUNHA *et al.*, 2017). Anticorpos policlonais produzidos em coelhos para a detecção de coproantígenos (EL-BADRY, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2010; SYKES; MCCARTHY, 2011) e imunocomplexos (GONÇALVES *et al.*, 2012a) também foram avaliados como ferramenta diagnóstica. A detecção de imunocomplexos também foi realizada com fragmentos de anticorpos recombinantes, scFv, selecionados por *phage display* (LEVENHAGEN *et al.*, 2015).

1.6 – *Phage display* para seleção de clones de fagos com peptídeos fusionados

A tecnologia de *phage display* foi descrita inicialmente por Smith (1985) e consiste na apresentação de polipeptídeos na superfície de fagos filamentosos, após a inserção de segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos. Dessa forma, o peptídeo ou proteína expressa ficará fusionado a uma proteína de origem endógena. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na obtenção de uma grande variedade de anticorpos, receptores e enzimas, em pesquisas para o mapeamento de epítomos e para o desenvolvimento de vacinas, drogas e ferramentas diagnósticas (HOOGENBOOM; HENDERIKX; de HAARD, 1998; IRVING; PAN; SCOTT *et al.*, 2001; LANZILLOTTI; COETZER, 2008; HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012; RAHBARNIA *et al.*, 2017).

Várias aplicações da técnica de *phage-display* no estudo de uma série de doenças foram descritas, como a formulação de anticorpos monoclonais compostos de regiões variáveis scFv conjugados com cadeias conservadas de anticorpos IgG, para o tratamento do lúpus eritematoso (EDWARDS *et al.*, 2003); no estudo experimental da malária, mapeando interações proteína-proteína na biologia do *Plasmodium* sp., e na identificação de candidatos vacinais e terapêuticos (LANZILLOTTI; COETZER, 2008); na seleção de marcadores para o sorodiagnóstico, vacinação e imunoterapia da leishmaniose (COELHO *et al.*, 2015); seleção de alvos e identificação de mimotopos correlatos a *Taenia solium* aplicados no estudo da neurocisticercose humana (RIBEIRO *et al.*, 2010; MANHANI *et al.*, 2011); seleção de scFv específicos a proteína HSP60 (*heat shock protein 60*) de *S. stercoralis*, e de peptídeos miméticos ligantes de IgG de pacientes com strongiloidíase, sendo ambas abordagens no diagnóstico da doença (FELICIANO *et al.*, 2014; LEVENHAGEN *et al.*, 2015; FELICIANO *et al.*, 2016).

A metodologia mais comumente utilizada é baseada no uso de bacteriófagos (linhagens M13, f1, fd, entre outras) pertencentes à família Inoviridae, que infectam *Escherichia coli* (BENHAR, 2001). Os fagos são formados por genoma do tipo DNA de fita simples, e envoltos por capsídeo formado pelas proteínas pIII, pVI, pVII pVIII e pIX. A função da pIII está intimamente relacionada com infectividade do fago, por meio de sua junção ao *pilus F* de uma *E. coli*. Uma vantagem da utilização de fagos filamentosos é a manutenção de uma infecção lisogênica, evitando a lise das bactérias utilizadas para amplificarem os peptídeos desejados (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002). Outra característica importante é que após o processo de seleção frente aos alvos escolhidos, é possível produzir

proteínas/peptídeos solúveis em culturas bacterianas de forma rápida e de fácil manuseio (BENHAR, 2001).

Utilizando bibliotecas de fagos que expressam uma grande variedade de moléculas em suas superfícies é possível selecionar as que mais se assemelham ao alvo de interesse. Dessa forma as etapas de *biopanning* (seleção por afinidade) e de *screening* (triagem ou validação) são fundamentais para a obtenção de estruturas polipeptídicas com elevado grau de especificidade. O processo de seleção de fagos preconiza a adesão e a interação dos clones virais aos alvos de interesse, podendo ser anticorpos, proteínas recombinantes ou peptídeos obtidos de diversas formas, caracterizando assim a etapa de seleção positiva. Os fagos ligados podem então ser eluídos por condições que desestabilizam as ligações com as moléculas alvo, sem que haja comprometimento no potencial de infectividade. Os clones que não se aderem, são considerados inespecíficos e são consequentemente eliminados durante o processo de seleção negativa. Os fagos recuperados e considerados específicos podem ser amplificados em colônias bacterianas, e triados em posteriores testes para a confirmação do grau de especificidade e para as consequentes aplicações laboratoriais. O processo de *biopanning* pode ser realizado em três a cinco ciclos, nas mesmas condições, para que haja um enriquecimento das partículas específicas e da exclusão de fagos não específicos (BARBAS *et al.*, 2001; BENHAR, 2001; BRIGIDO; MARANHÃO, 2002).

Uma das possibilidades da utilização da técnica de *phage-display* consiste na seleção de clones de bacteriófagos que expressam peptídeos randômicos fusionados à pIII, ligantes de anticorpos específicos. Esses anticorpos podem ser obtidos de amostras séricas de pacientes com alguma enfermidade ou de outras fontes biológicas. Dessa forma, podem ser identificados potenciais epítomos relacionados com a resposta imune de diversas doenças. Os peptídeos ligantes, após as etapas de sequenciamento e triagem, podem ser referidos como miméticos a estruturas antigênicas do alvo de seleção (AZZAZI; HIGHSMITH, 2002; FELICIANO *et al.*, 2014; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2015). Essa aplicação metodológica é comumente utilizada com intuito do desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e tratamento, principalmente de doenças infecciosas (VERGOTE *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2014; RAHBARNIA *et al.*, 2017). Diante da possibilidade de produção de anticorpos específicos em mamíferos ou aves contra proteínas antigênicas de parasitos, como *Strongyloides* sp., ou até mesmo pela purificação direta de amostras de soro de pacientes infectados, essa é uma técnica promissora para a seleção de peptídeos que mimetizam proteínas de *S. stercoralis*. Essas estruturas depois de identificadas e amplificadas, podem ser utilizadas no estudo da strongiloidíase experimental, imunodiagnóstico e como candidatos

vacinais para a doença (FELICIANO *et al.*, 2014; FELICIANO *et al.*, 2016; RAHBARNIA *et al.*, 2017).

1.7 – Tecnologia IgY

Os ovos de galinhas além de serem considerados excelentes fontes nutricionais para animais e seres humanos, também são utilizados como fonte de produção de anticorpos policlonais IgY (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Em mamíferos são conhecidas cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, classificadas de acordo com suas cadeias pesadas. Nas galinhas três classes foram identificadas: IgM e IgA, homólogas às provenientes de mamíferos e circulantes no sangue e em secreções corporais; além da IgY, encontrada no soro e transferida para as gemas dos ovos por meio de receptores específicos presentes no folículo ovariano em formação, conferindo imunidade passiva para embriões e neonatos. Considerando os ovos, IgY é a única classe de imunoglobulinas encontrada nas gemas, sendo que IgA e IgM estão presentes apenas na clara. As células linfocitárias responsáveis pela produção dos anticorpos nas galinhas estão associadas principalmente com a *bursa de Fabricius* e o baço (SCHADE *et al.*, 2005; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008; ÓLAH; VELVERDE, 2008; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

As imunoglobulinas Y apresentam semelhança funcional com a IgG encontrada em mamíferos, mas apresentam diferenças estruturais e nas características físico-químicas. As cadeias pesadas da IgY (CP ν) possuem um domínio variável (VH) e quatro domínios constantes (CH1; CH2; CH3 e CH4), enquanto as cadeias pesadas da IgG (CP γ) são compostas por um domínio variável (VH) e três domínios constantes (CH1; CH2; CH3) (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Outra característica estrutural da IgY é a ausência da região de dobradiça entre os domínios CH1 e CH2, conferindo menor flexibilidade ao fragmento Fab quando comparada com a IgG (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; CHALGHOUMI *et al.*, 2008). Como as galinhas apresentam menos genes que os mamíferos relacionados à geração da diversidade do reconhecimento antigênico pelas imunoglobulinas, este processo ocorre por meio de um rearranjo gênico, seguido pela conversão gênica com pseudogenes, isto é, genes não codificantes, que funcionam como doadores de segmentos de DNA (RATCLIFFE, 2006). As IgY apresentam peso molecular aproximado de 180 kilodaltons (kDa), enquanto as moléculas de IgG apresentam peso aproximado de 150 kDa. Em relação ao ponto isoelétrico os anticorpos IgY situam-se na faixa de pH entre 5,7-7,6,

enquanto a IgG se encontra na faixa de pH (6,1-8,5) (HATTA *et al.*, 1993; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

A produção e a utilização de anticorpos IgY apresentam várias vantagens sobre os anticorpos IgG de mamíferos, principalmente em relação a grande massa de imunoglobulinas em cada ovo; a redução do sofrimento e dano animal por evitar a sangria das galinhas; facilidade no isolamento e purificação das gemas; redução no número de animais utilizados e, conseqüentemente, redução de despesas (TINI *et al.*, 2002; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; SPILLNER *et al.*, 2012). Além disso, a distância evolutiva entre mamíferos e aves permite a produção de anticorpos contra proteínas derivadas de mamíferos, com alta especificidade e menor quantidade de antígeno necessária para o desenvolvimento da resposta imunológica (LARSSON; CARLANDER; WILHELMSSON, 1998). Outras características importantes das imunoglobulinas Y, ao contrário das IgGs, são a incapacidade de fixação de moléculas do sistema complemento de mamíferos, a ausência de ligação entre receptores para fragmentos Fc de mamíferos e as proteínas estafilocócica A e estreptocócica G. Dessa forma, a utilização de anticorpos IgY pode evitar a ocorrência de reatividade cruzada em ensaios com anticorpos de mamíferos (ERHARD; SCHADE, 2001; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010; SPILLNER *et al.*, 2012).

As imunizações das galinhas podem ser realizadas com uma grande variedade de antígenos proteicos, proteínas recombinantes, haptenos acoplados a proteínas carreadoras, antígenos acoplados a lipossomos e com plasmídeos recombinantes com genes do imunógeno alvo (ALESSANDRO *et al.*, 2009; YAGUCHI *et al.*, 2009; MULVEY *et al.*, 2011; NERI *et al.*, 2011; NIKBAKHT BRUJENI; JALALI; KOOHI, 2011; DING *et al.*, 2012). Após as imunizações, os ovos são coletados e deles são extraídas as gemas para a posterior purificação dos anticorpos policlonais IgY (AMARAL *et al.*, 2002). A purificação ocorre basicamente com a remoção da fração lipídica das gemas por meio de adição de água deionizada e acidificada e precipitação das imunoglobulinas com adição de sulfato de amônio ou de sódio, e/ou através de técnicas cromatográficas variadas (SUI; CAO; LIN, 2011; WEN *et al.*, 2012).

Após as técnicas de purificação e fracionamento, os anticorpos IgY selecionados podem ser caracterizados e aplicados em diversas áreas de pesquisas, diagnósticos e em ferramentas biotecnológicas (CARLANDER *et al.*, 2000; ZHANG, 2003). Vários estudos comprovaram efeito protetor na imunização passiva de IgY em infecções virais de interesse veterinário (YOUSIF *et al.*, 2006; VEGA *et al.*, 2011; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012) e contra bactérias e produtos microbianos em animais de produção (ZHEN *et al.*, 2009;

MAHDAVI *et al.*, 2010; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Outros autores demonstraram ainda eficácia em tratamentos profiláticos e terapêuticos contra o vírus influenza (NGUYEN *et al.*, 2010). Os anticorpos IgY também foram aplicados em imunizações contra bactérias patogênicas e toxinas bacterianas de interesse médico (HORIE *et al.*, 2004; PAULY *et al.*, 2009). Outros estudos demonstraram a alta capacidade de reconhecimento antigênico das imunoglobulinas Y em ensaios com *beads* magnéticas (LEI *et al.*, 2012), em tecidos fixados (DIAZ *et al.*, 2009; BENTES *et al.*, 2015), em ensaios com citometria de fluxo (LEU *et al.*, 2010), e em testes ELISA e *Western blot* (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2012; GRZYWA *et al.*, 2014). Os anticorpos IgY mostraram potencial na neutralização de toxinas de peçonhas de serpentes (ARAÚJO *et al.*, 2010; DUAN *et al.*, 2016). As técnicas de produção de IgY foram realizadas para o estudo de diversos parasitos como *Eimeria* spp. (CONSTANTINOIU *et al.*, 2008), *Plasmodium falciparum* (QU *et al.*, 2011), *Cryptosporidium parvum* (KOBAYASHI *et al.*, 2004), *Toxoplasma gondii* (FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2012), *Schistosoma japonicum* (LEI *et al.*, 2012), *Trichinella spiralis* (LIU *et al.*, 2013) e *Taenia solium* (MANHANI *et al.*, 2011).

Com o intuito do desenvolvimento de uma nova ferramenta no estudo da estrogiloidíase experimental, com possíveis aplicações no diagnóstico sorológico e na terapêutica da doença em humanos, o presente estudo tratou da produção inédita de anticorpos IgY policlonais contra extratos antigênicos de *Strongyloides venezuelensis*. Após a obtenção dos anticorpos fracionados, os mesmos foram caracterizados no reconhecimento antigênico do parasito e aplicados como ferramenta imunodiagnóstica da estrogiloidíase humana. Também foram utilizados em *phage-display*, para a seleção de clones de fagos fusionados a peptídeos ligantes das moléculas IgY selecionadas, com potencial no diagnóstico sorológico da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 – Geral

Produzir, fracionar e caracterizar anticorpos IgY específicos a larvas filarioides infectantes (iL3) e fêmeas partenogenéticas (Fp) de *S. venezuelensis*. Aplicar os anticorpos IgY no reconhecimento antigênico de formas de vida do parasita, na seleção de peptídeos ligantes por *phage-display* e no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

2.2 – Específicos

- Desenvolver resposta imunológica em galinhas de postura contra proteínas antigênicas do extrato total de larvas filarioides (iL3) e fêmeas partenogenéticas (Fp) de *S. venezuelensis*; larvas filarioides (L3Ac) de *Ancylostoma ceylanicum* e adultos (AAs) de *Ascaris suum*;
- Purificar anticorpos IgY policlonais por cromatografia líquida de interação tiofílica, provenientes de gemas de ovos de galinhas imunizadas com antígenos proteicos;
- Caracterizar os anticorpos IgY purificados contra larvas filarioides (IgY anti-iL3) e fêmeas partenogenéticas (IgY anti-Fp) de *S. venezuelensis*, larvas filarioides de *A. ceylanicum* (IgY anti-L3Ac) e adultos de *A. suum* (IgY anti-AAs) quanto à especificidade, cinética de produção e maturação da avidéz por ELISA indireto;
- Avaliar o padrão de reconhecimento dos anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp a componentes proteicos específicos de formas de vida de *S. venezuelensis* por *Immunoblotting*;
- Verificar o reconhecimento, pelas IgY, de formas parasitárias em reações de imunofluorescência (RIFI) em cortes histológicos de larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*;
- Aplicar os anticorpos IgY purificados anti-iL3 e anti-Fp na detecção, por ELISA, de imunocomplexos em soros de pacientes com estrogiloidíase confirmada;
- Selecionar peptídeos miméticos com afinidade de ligação aos anticorpos selecionados (IgY anti-iL3 e IgY anti-Fp) por *phage-display*;
- Realizar o sequenciamento dos fagos selecionados para aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana;
- Confirmar a imunoreatividade e o potencial no diagnóstico da estrogiloidíase humana dos fagos recombinantes selecionados, por meio do ensaio *phage-ELISA*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Aspectos éticos

O estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas, no Laboratório de Nanobiotecnologia e no Laboratório de Bioquímica e Toxinas de Animais do Instituto de Genética e Bioquímica, localizados na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob orientação da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e coorientação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

O manejo e a utilização dos animais foram aprovados a partir de análise final nº 029/15, pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) para o protocolo de registro CEUA/UFU 097/14. A proposta de utilização das amostras de soros humanos na avaliação dos anticorpos IgY produzidos como ferramenta diagnóstica para a estrogiloidíase, foi submetida e aprovada via Plataforma Brasil, CAAE: 48492315.8.0000.5152.

A cepa de *S. venezuelensis* foi mantida em ratos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* no Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais/UFU (CEP/UFU) - protocolo 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 humanos utilizadas neste estudo encontraram-se armazenadas no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) - protocolo 04/2008.

A cepa de *A. ceylanicum* é 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). As larvas (L3Ac) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elida Mara Leite Rabelo para a produção antigênica. Os adultos de *A. suum* foram gentilmente cedidos por frigorífico da região de Uberlândia, Minas Gerais, logo após o abate de suínos infectados.

As aplicações metodológicas do estudo são resumidas na Figura 1, demonstrando desde a produção dos anticorpos IgY, o processo de purificação e caracterização dos mesmos, até as validações em ensaios para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

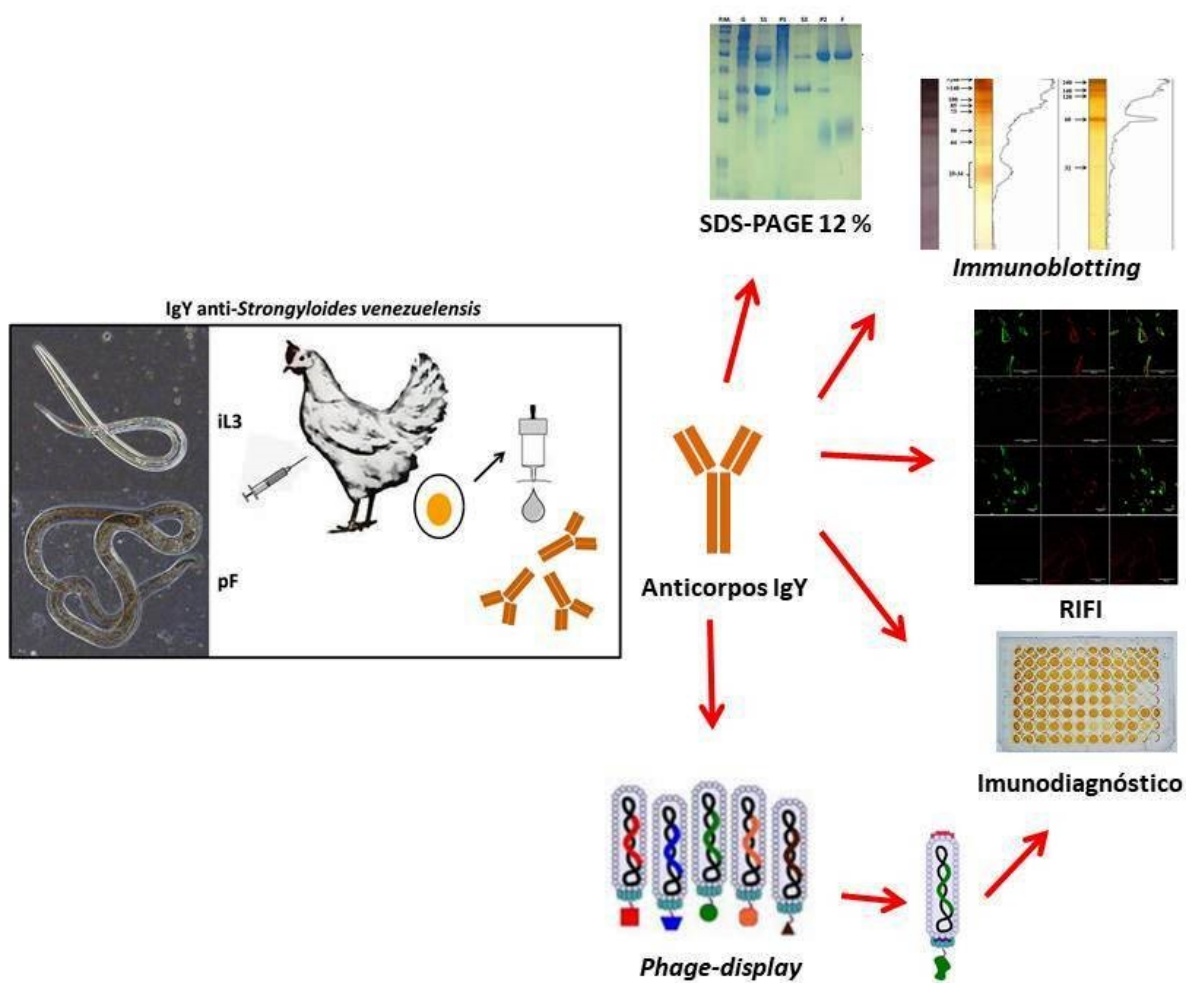


Figura 1 - Esquema das etapas metodológicas empregadas no estudo. O trabalho evidencia a produção e purificação de anticorpos IgY anti-*S. venezuelensis*, que foram caracterizados em ensaios ELISA, *Immunoblotting*, RIFI e aplicados no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana. Os anticorpos também foram usados para a seleção de peptídeos ligantes por *phage-display*, para posterior aplicação diagnóstica.

3.2 – Amostras de soros humanos

Foram utilizadas 135 amostras de soros de pacientes, divididos em três grupos:

- **Grupo I (Positivos)** - 45 amostras de soro de pacientes monoparasitados com diagnóstico confirmado para *estrongiloidíase*, utilizando métodos parasitológicos.
- **Grupo II (Negativos)** - 45 amostras de soros de indivíduos saudáveis, residentes em área endêmica para *estrongiloidíase*, com ausência de sinais clínicos e negativos em exames parasitológicos.
- **Grupo III (Outras Parasitoses)** - 45 amostras de soros de pacientes monoparasitados com outras doenças parasitárias incluindo *Ascaris lumbricoides* (n = 6), *Enterobius vermicularis* (n = 6), ancilostomatídeos (n = 7), *Schistosoma mansoni* (n = 6), *Hymenolepis nana* (n = 4), *Taenia* sp. (n = 6) e *Giardia lamblia* (n = 6) e *Entamoeba histolytica/dispar* (n = 4), com diagnósticos confirmados por exames parasitológicos.

Todas as amostras de soros foram provenientes de indivíduos que foram submetidos a exames parasitológicos de fezes, realizados com pelo menos três amostras de cada indivíduo, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (1919).

3.3 – Obtenção e produção de extratos antigênicos de larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides venezuelensis*, larvas filarioides de *Ancylostoma ceylanicum* e adultos de *Ascaris suum*

A espécie *Strongyloides venezuelensis* foi mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no CBEA/UFU.

Os ovos de *S. venezuelensis*, obtidas das fezes de ratos Wistar infectados foram mantidos em cultura de carvão mineral por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (1905) *apud* NEVES *et al.*, 2011, até o desenvolvimento em larvas filarioides infectantes, depois recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brizola (1954), e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos em PBS (pH 7,2) (Fig. 2.1).

Para a recuperação das fêmeas partenogenéticas, os ratos experimentalmente infectados foram sacrificados, após anestesia (tiopental sódico 160 mg/kg) no 8º dia pós-infecção. Em seguida, os intestinos delgados foram removidos, colocados em placa de Petri,

contendo solução salina, seccionados longitudinalmente e incubados a 37 °C por duas horas. Após a recuperação das fêmeas partenogenéticas, as mesmas foram contadas segundo Sato; Toma (1990) (Fig. 2.2).

Para obtenção das larvas filarioides de *A. ceylanicum* foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com idade de quatro semanas, provenientes do 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, durante sete dias. Após este período, as (L3Ac) obtidas foram recuperadas pelo Método de Rugai, Mattos e Brizola (1954) e centrifugadas entre 4 e 5 vezes por 1 min com PBS para limpeza (BARÇANTE *et al.*, 2003) (Fig 2.3).

Os adultos de *A. suum* foram gentilmente cedidos por um frigorífico da região de Uberlândia-MG após o abate de suínos infectados e análise interna do intestino grosso (Fig 2.4).

Os extratos antigênicos salinos totais (E.A.) foram produzidos a partir de 300.000 larvas filarioides, de 2.500 fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*, de 100.000 larvas filarioides de *A. ceylanicum* e fragmento de cerca de 2 cm de um indivíduo adulto de *Ascaris suum* conforme Gonzaga *et al.* (2013), com algumas modificações. Os parasitos foram ressuspensos em PBS pH 7,2 contendo inibidores de proteases (Complete ULTRA Tabletes, Roche, Suíça) e rompidos em ciclos de congelamento com nitrogênio líquido (1 min, -196 °C), maceração mecânica e descongelamento (37 °C). Após completa homogeneização verificada em microscópio, as suspensões foram centrifugadas (12.400 x g, 30 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram quantificados quanto a dosagem proteica pelo método de Lowry *et al.* (1951). A qualidade do processo de extração antigênica foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12 %) e os E.A. foram armazenados a -20 °C.

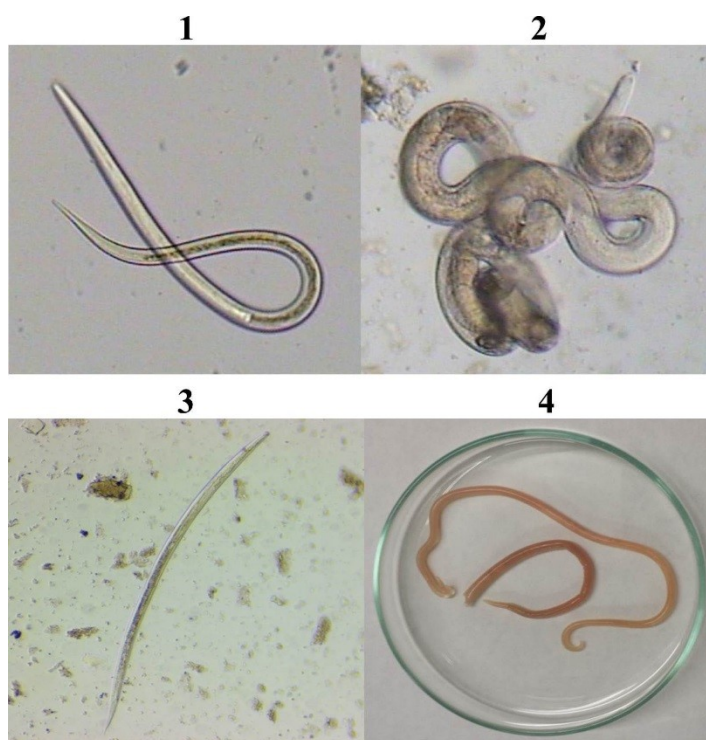


Figura 2 – Espécies utilizadas para o preparo dos extratos antigênicos usados nas imunizações das galinhas. **1.** larvas filarioides infectantes de *Strongyloides venezuelensis*; **2.** fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*; **3.** larvas filarioides infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*; **4.** adultos de *Ascaris suum*.

3.4 – Galinhas poedeiras e imunizações

Foram utilizadas dez galinhas poedeiras *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) da linhagem *Hisex*, 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*. Todos os E.A. utilizados para as imunizações foram preparados nas mesmas condições. Cinco grupos de galinhas poedeiras, com dois animais em cada, foram separados de acordo com as imunizações e a especificidade dos anticorpos IgY produzidos:

- **Grupo 1** – galinhas imunizadas com EA de iL3;
- **Grupo 2** – galinhas imunizadas com EA de Fp;
- **Grupo 3** – galinhas imunizadas com EA de L3Ac;
- **Grupo 4** – galinhas imunizadas com EA de AAs;
- **Grupo 5** – galinhas inoculadas com solução salina (PBS).

As imunizações das galinhas para a obtenção de anticorpos IgY policlonais foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Schwarzkopf *et al.* (2001). Foram realizadas cinco imunizações com intervalo de 14 dias, via intramuscular, profunda, no músculo peitoral em diferentes pontos. As galinhas foram avaliadas pela possível ocorrência de processos inflamatórios locais ou apresentação de efeitos adversos na quantidade de ovos produzidos. As aplicações foram realizadas obedecendo as seguintes administrações:

- **1ª imunização** - volume total de 500 µl (100 µg dos E.A. em volume final de 250 µl PBS + 250 µl de adjuvante completo de Freund) (Sigma-Aldrich, EUA);
- **2ª – 5ª imunizações** - volume total de 500 µl (100 µg dos E.A. em volume final de 250 µl PBS + 250 µl de adjuvante incompleto de Freund) (Sigma-Aldrich, EUA);

As galinhas do grupo controle (Grupo V) foram inoculadas da mesma forma, exceto pela ausência dos antígenos parasitários. Em semanas alternadas às imunizações, também em intervalos de 14 dias, foram coletadas amostras de sangue para obtenção de soro dos animais. O soro foi utilizado para o acompanhamento da cinética de conversão de anticorpos IgY com especificidade aos alvos antigênicos utilizados (Tabela 1).

3.5 – Coletas dos ovos e armazenamento das gemas

A coleta dos ovos foi iniciada uma semana antes das imunizações e continuou por 10 semanas após. Todos os ovos foram coletados, identificados de acordo com o grupo de imunizações e armazenados a 4 °C, de acordo com a semana de coleta. As cascas foram higienizadas com etanol 70 %, e em seguida separadas as gemas das claras. As gemas intactas foram colocadas sobre folhas de papel filtro e lavadas abundantemente com PBS. Após secagem do excesso de PBS, a membrana vitelínica foi rompida, o conteúdo foi mensurado e utilizado nas etapas seguintes do processo de purificação e fracionamento dos anticorpos IgY. As gemas correspondentes a cada semana de postura foram reunidas em um mesmo tubo para formar o *pool* semanal para posteriores análises (Tabela 1).

Tabela 1 - Período de duração do acompanhamento experimental com as galinhas poedeiras. As atividades de coleta de ovos e de sangue para obtenção de soro começaram uma semana antes da primeira dose de imunização (Semana 0). As coletas de ovos foram realizadas diariamente e agrupadas em semanas. As imunizações e coletas de sangue foram realizadas quinzenalmente em semanas alternadas.

Semanas	Período (dias)	Atividade
0	1-7	(Pré-imune), 1ª coleta de sangue, ovos
1	8-14	1ª imunização, ovos
2	15-21	2ª coleta de sangue, ovos
3	22-28	2ª imunização, ovos
4	29-35	3ª coleta de sangue, ovos
5	36-42	3ª imunização, ovos
6	43-49	4ª coleta de sangue, ovos
7	50-56	4ª imunização, ovos
8	57-63	5ª coleta de sangue, ovos
9	64-70	5ª imunização, ovos
10	71-77	6ª coleta de sangue, ovos

3.6 – Fracionamento e purificação dos anticorpos IgY policlonais

A primeira etapa de fracionamento dos anticorpos IgY policlonais foi a retirada da fração lipídica das gemas de acordo com o método descrito por Akita e Nakai (1993). As gemas foram homogeneizadas com água ultrapura e acidificada (pH 5,0–5,2) na proporção de 1:15. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa por 30 minutos à T.A. e ao final o pH foi ajustado para 5,5 com adição de tampão acetato de sódio (0,06 M, pH 4,8). Em seguida a mistura foi centrifugada a 800 x g por 45 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante ajustado para a faixa de pH de 7,0–7,4 por meio da adição hidróxido de sódio (0,1 M).

A segunda etapa do processo de fracionamento consistiu na precipitação das proteínas totais da solução previamente delipidizada. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio (Sigma-Aldrich, EUA), sob agitação lenta até a concentração final de 20 % (m/v). Após completa homogeneização, por duas horas em T.A., a solução foi centrifugada a 2.000 x g por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em PBS, considerando o volume inicial da solução delipidizada na proporção de 1:10. As amostras

purificadas de cada foram lidas a 280 nm em espectrofotômetro (UV-Vis Biodrop μ Lite, Reino Unido) para dosagem proteica.

A terceira etapa foi realizada por meio da purificação das amostras fracionadas em cromatografia líquida de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA Prime (GE Healthcare, EUA). As amostras foram previamente lavadas e concentradas em sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA), utilizando membrana com corte de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA), com tampão de ligação fosfato de sódio e sulfato de potássio (Na_2HPO_4 , 0,02 M, K_2SO_4 0,5 M, pH 7,5). Após a concentração, as amostras foram aplicadas e aderidas na coluna *HiTrap IgY Purification HP*, 5 mL (Amersham Biosciences, EUA) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Com um fluxo de 1 mL/min os anticorpos foram eluídos utilizando gradiente linear de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5 (Figura 3).

A confirmação do processo de purificação dos anticorpos IgY específicos foi determinada após cada corrida cromatográfica, por meio de *dot blot* (dados não apresentados). Para isso, membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com 10 μ L das amostras fracionadas. Após secagem da membrana, em temperatura ambiente, foi realizado bloqueio com PBS acrescido de Tween 20 0,05 % e leite desnatado 5 % (PBS-T-M 5 %), por duas horas, sob agitação lenta. Após o bloqueio, foram realizados seis ciclos de lavagem com PBS acrescido de Tween 20 0,05 % (PBS-T). A presença dos anticorpos IgY foi detectada pela adição de anticorpos IgG anti-IgY, produzido em coelhos, conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), na diluição de 1:20.000, em PBS-T-M 1 %, e incubados por duas horas em temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após seis lavagens com PBS-T, a reação foi revelada pela adição 10 mg de 3,3' - *diaminobenzidino tetrahydroclorato* (DAB, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em 15 mL de salina tamponada com Tris (TBS) e 12 μ L de peróxido de hidrogênio 30 % (Sigma-Aldrich, EUA). A revelação foi interrompida por meio de seis lavagens de cinco minutos em água ultrapura. O controle negativo foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) nas mesmas condições.

As frações contendo os anticorpos IgY foram coletadas, dialisadas com água ultrapura e concentradas no sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA) com membrana de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA). A concentração de proteínas (anticorpos IgY) foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro (UV-Vis Biodrop μ Lite, Reino Unido). As amostras dosadas foram liofilizadas e armazenadas à -20 °C até as posteriores aplicações (Figura 3).

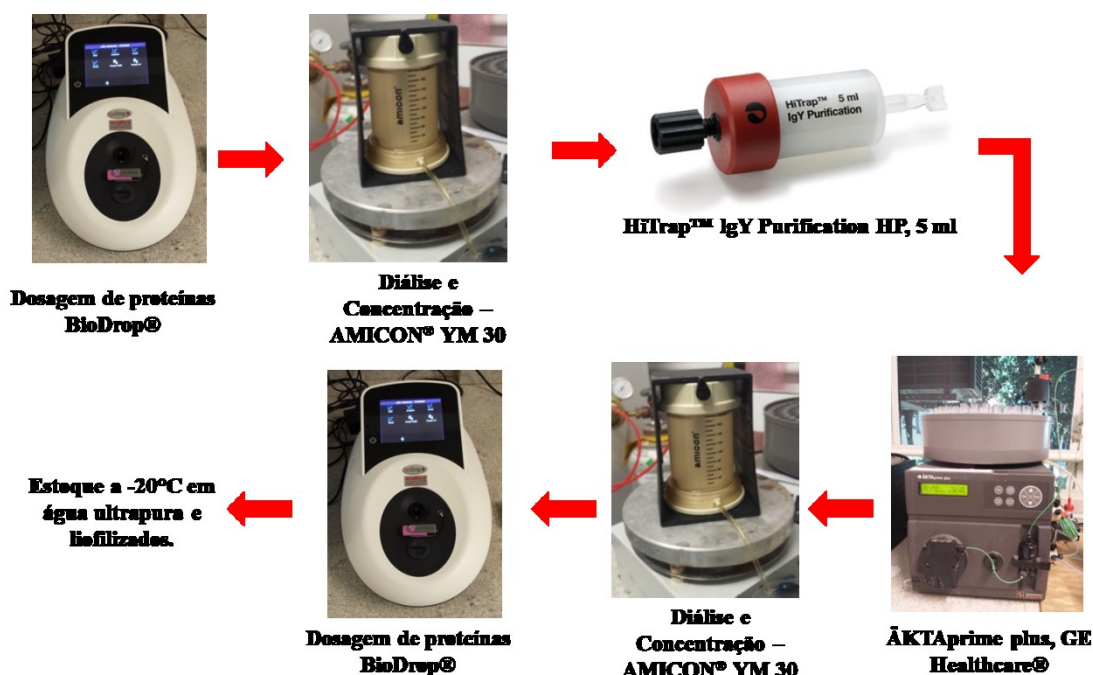


Figura 3 - Processo de fracionamento dos anticorpos IgY. As amostras derivadas da precipitação proteica foram dosadas a 280 nm em espectrofotômetro (UV-Vis Biodrop μ Lite, Reino Unido); concentradas em sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA) utilizando membrana com corte de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA) e fracionadas por cromatografia de afinidade em sistema completo ÄKTA Prime (GE Healthcare, EUA). A separação das moléculas de IgY foi realizada pela coluna específica HiTrap IgY Purification HP, 5 mL. Após a eluição das frações contendo os anticorpos IgY, elas foram novamente concentradas, dosadas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C

3.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %)

Os processos de preparação antigênica, de fracionamento e purificação dos anticorpos IgY foram avaliados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %), sob condições desnaturantes. As amostras resultantes do fracionamento de IgY foram conduzidas em condições redutoras, ao contrário dos preparados antigênicos, segundo Laemmli (1970). Aliquotas de 10 μ g de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM [pH 6,8] + SDS 4 % + azul de bromofenol 0,2 % + glicerol 20 %) com acréscimo de 2-mercaptoethanol 5 % (Sigma-Aldrich, EUA), quando em condições redutoras. As amostras foram submetidas à fervura por 5 min em banho-maria, e separadas em géis de concentração 12 % [tampão Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8); dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,1 %, EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida (29:1); tetrametiletilenediamino (TEMED) 0,125 %; persulfato de amônio (APS) 0,125 %]. As eletroforeses foram conduzidas em sistema completo vertical (SE 300 miniVE, Hoefer, EUA) com corrente contínua de 20 mA/gel e tampão de corrida Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 5,5 mM SDS).

Para identificação dos pesos moleculares em kiloDaltons (kDa) aparentes das bandas polipeptídicas, foi utilizado um marcador padrão de peso molecular em concomitância com as amostras em separação (RECOM BLUE Wide Range Protein Marker, Real Biotech, Taiwan). As bandas polipeptídicas foram coradas com *Coomassie Brilliant blue* G-250 (Sigma-Aldrich, EUA).

3.8 – Cinética de produção de anticorpos IgY específicos por ELISA indireto

Para a determinação da cinética de produção dos anticorpos IgY provenientes do soro e das gemas das galinhas imunizadas foram realizados testes ELISA do tipo indireto. Amostras de soro e de anticorpos IgY purificados das gemas de todos os grupos de imunizações foram avaliadas. As concentrações ótimas foram submetidas a titulações em bloco, para a obtenção do ensaio com maior razão sinal/ruído. Microplacas de poliestireno, 96 poços (Greiner BioOne, Áustria), foram sensibilizadas com 50 µl de extratos antigênicos de iL3, Fp, L3Ac e AAs (10 µg/mL) em tampão carbonato/bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), *overnight* a 4 °C. Em seguida, os poços foram bloqueados com PBS-T-M 1 % por 1h a 37 °C. Após três ciclos de cinco minutos de lavagem com PBS-T, as amostras de IgY purificadas das gemas (2 µg/poço) e do soro (1:200) foram diluídas em PBS-T-M 1 % (50 µl/poço), aplicadas em duplicata e incubadas por 1h a 37 °C. Amostras pré imunização e dos animais controles constituíram os controles negativos. Após novas lavagens com PBS-T, foi adicionado o anticorpo secundário, produzido em coelhos, anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:15.000 em PBS-T-M 1 % (50 µL/poço) e incubado por 1h a 37 °C. Após novos processos de lavagem, a reação foi revelada pela adição de solução cromógena a 50 µL/poço [10 mg *o*-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) acrescido de 10 µL de peróxido de hidrogênio a 30 % (Merck, Alemanha) e 25 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5]. Após 15 min à T.A., e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL de solução de H₂SO₄ 2N. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor de microplacas (TP Reader, Thermo Plate, Brasil).

Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE) calculado com os valores médios de densidade óptica (DO) de cada semana acompanhada, divididos pelo *cut-off*, que foi obtido pela soma das médias de DO das amostras do grupo controle (inoculados com PBS) mais 3 vezes o desvio padrão. Do grupo controle foram utilizados os valores de DO das seis primeiras semanas de imunização para o cálculo do IE das gemas purificadas e das cinco

primeiras semanas para o cálculo do IE das amostras de soro das galinhas. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

3.9 – ELISA avidéz

A maturação de avidéz dos anticorpos IgY presentes nas gemas foi investigada pelo tratamento dos imunocomplexos, formados pela ligação com os alvos antigênicos específicos, com ureia 6 M, seguida pela determinação da reatividade residual por meio de ELISA indireto. Após a etapa de incubação dos anticorpos IgY totais com os extratos antigênicos de todos os grupos de imunizações, conforme descrito no item 3.8, metade dos poços foi incubada com 50 µL de uma solução de ureia 6 M em PBS (pH 7,2) e a outra metade com PBS (pH 7,2), por 5 min à T.A. Na sequência, as placas foram lavadas por cinco vezes com PBS-T. A detecção da atividade residual foi realizada pela incubação com anticorpos secundários anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluídos 1:15.000 em PBS-T-M 1 %, por 1h a 37 °C. As etapas seguintes foram realizadas de acordo com o item 3.8. O cálculo do índice de avidéz (IA) para cada amostra de IgY, foi realizado por meio da determinação da razão entre a DO obtida nos anticorpos tratados com ureia (U^+) e dos não tratados com ureia (U^-), sendo o resultado expresso na forma de porcentagem, conforme a fórmula: $IA = DO\ U^+ / DO\ U^- \times 100$. Valores de IA < 40 % foram considerados como baixa avidéz e IA > 60 % como alta avidéz (VILIBIC-CAVLEK *et al.*, 2016).

3.10 – Immunoblotting

O padrão de reconhecimento de bandas polipeptídicas dos E.A. de iL3 e Fp de *S. venezuelensis* pelos anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp foi avaliada por *Immunoblotting* unidimensional convencional conforme Silva *et al.* (2007).

Inicialmente, 250 µg de antígenos iL3, Fp e o padrão de peso molecular foram submetidos a separação por SDS-PAGE em géis 12 %, sob condições desnaturantes e não redutoras, conforme descrito no item 3.7. Em seguida, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm (GE-Osmonics Inc., EUA) de dimensões: 8 cm de largura x 6 cm de altura, utilizando um sistema de transferência úmido (SE 300 miniVE, Hoefer, EUA) com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20 %) de acordo com Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Após a eletrotransferência a 300 mA, por 1 h e 40 min, as membranas foram coradas com solução de

Ponceau S (Sigma-Aldrich, EUA) para visualização das bandas proteicas. Depois da verificação da transferência dos antígenos, as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm de largura. Na sequência, os sítios livres foram bloqueados para evitar interações inespecíficas pela incubação com PBS-T-M 5 %, por 2h à T.A., sob agitação lenta. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas seis vezes com PBS-T, por 5 min à T.A. As incubações dos antígenos de iL3 e Fp com os anticorpos IgY anti-iL3 e IgY anti-Fp foram realizadas em duplicata. Foram utilizadas amostras de anticorpos IgY do *pool* semanal que apresentou, no ELISA indireto convencional, os maiores valores de IE. Cada tira de nitrocelulose foi incubada com 15 µg de anticorpos IgY purificados anti-iL3 e anti-Fp, diluídos em PBS-T-M 1 %, *overnight* a 4 °C. As fitas foram novamente lavadas, conforme descrito. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase diluído a 1:15.000 em PBS-T-M 1 %, por 2h à T.A. A revelação foi realizada com adição de 10 mg de 3,3' – *diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate* (DAB-Sigma Fast tablets, Sigma-Aldrich, EUA), diluído em 15 mL de solução tamponada com Tris (TBS 0,02 M, pH 7,4), acrescido de 12 µL de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha) a 30 %. A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.11 – Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados para caracterizar o reconhecimento de cortes de larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* pelos anticorpos IgY purificados anti-iL3 e anti-Fp. Os parasitos foram incluídos em *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, Holanda) e congelados a -70 °C. Secções de 2 µm de espessura foram cortadas utilizando criomicrotomo. Os cortes foram aderidos em lâminas de microscopia e mantidos 30 min à T.A. Os anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp foram adicionados (50 µL) aos cortes histológicos na concentração de 300 µg/mL e incubados a 37 °C por 1 h, em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS em seis ciclos de 5 min cada, e então, incubados com anticorpo secundário produzido em coelhos, anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:300) diluído em azul de Evans 3 % (Vetec, Brasil), por 45 min a 37 °C. Após novas lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando glicerina tamponada (pH 9,0). As imagens foram obtidas utilizando microscópio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Alemanha). Cortes histológicos de formas metacestódeas de *Taenia solium* foram utilizados para controle negativo das reações nas mesmas condições para cada anticorpo produzido.

3.12 – Anticorpos IgY para a detecção de imunocomplexos em amostras de soros humanos

Os anticorpos IgY purificados anti-*S. venezuelensis* foram avaliados quanto ao potencial de detecção de imunocomplexos circulantes em soros de pacientes com strongiloidíase. A aplicação diagnóstica foi realizada em placas de microtitulação de poliestireno, 96 poços, de alta afinidade (Greiner BioOne, Austria) por meio de ensaios ELISA sanduíche. As microplacas foram aderidas com os anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp (10 µg/ml) e diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), *overnight* a 4 °C. Após a incubação dos anticorpos, as placas foram lavadas em três ciclos de 5 min com PBS-T. O bloqueio de sítios de ligações inespecíficos foi realizado pela adição de PBS-T-M 3 % (45 min, a 37 °C). Após três ciclos de lavagens, as amostras de soros humanos (positivos, negativos e outras parasitoses) foram adicionadas diluídas (1:60) em PBS-T-M 1 % e incubadas por 45 min a 37 °C. As placas foram lavadas, como descrito anteriormente, e foi adicionado anticorpos secundários IgG produzido em cabras (anti-IgG humana) conjugado com peroxidase, Fc específicos (Sigma-Adrich, EUA) diluídos (1:2.000) em PBS-T-M 1 %. As etapas seguintes de incubação, lavagens e revelação ocorreram de acordo com as descritas no item 3.8. Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / cut \text{ off}$. Para o estabelecimento do *cut-off*, foi performada análise pela curva *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC) utilizando valores de DO das amostras de soro de todos os indivíduos aparentemente saudáveis e com outras parasitoses. Os resultados foram considerados positivos quanto $IE > 1,0$.

3.13 – Biopanning

A técnica de *phage display* foi utilizada para a seleção de peptídeos expressos em bacteriófagos, ligantes das moléculas de IgY fracionadas de acordo com Barbas *et al.*, (2001). Duas estratégias de seleções positivas foram realizadas, sendo uma para cada anticorpo IgY específico ao *S. venezuelensis* (anti-iL3 e anti-Fp). Os anticorpos IgY anti-L3Ac e anti-AAs foram utilizados para a seleção negativa dos clones, em ambas as estratégias, e nas mesmas condições para a eliminação de clones que expressavam peptídeos inespecíficos. Primeiramente, os ciclos de *biopanning* foram realizados contra os anticorpos IgY inespecíficos (anti-L3Ac e anti-AAs) e após, por meio da ligação com os anticorpos IgY específicos (anti-iL3 e anti-Fp), sendo cada estratégia independente uma da outra. A

biblioteca de bacteriófagos filamentosos M13 era composta por clones com peptídeos randômicos de 7 aminoácidos (Ph.D.-C7C, New England BioLabs, Inglaterra), flanqueados por dois resíduos de cisteína nas extremidades, espaçados por duas regiões Gly-Gly-Gly e fusionados na região N-terminal da proteína III do capsídeo. A biblioteca utilizada apresenta $1,2 \times 10^9$ possíveis combinações aleatórias de resíduos de aminoácidos.

As seleções foram realizadas em microplacas de poliestireno de alta afinidade (Greiner BioOne, Áustria), que foram previamente adsorvidas (150 μ L/poço) com anticorpos IgY (100 μ g/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6), *overnight* a 4 °C conforme a Figura 4.

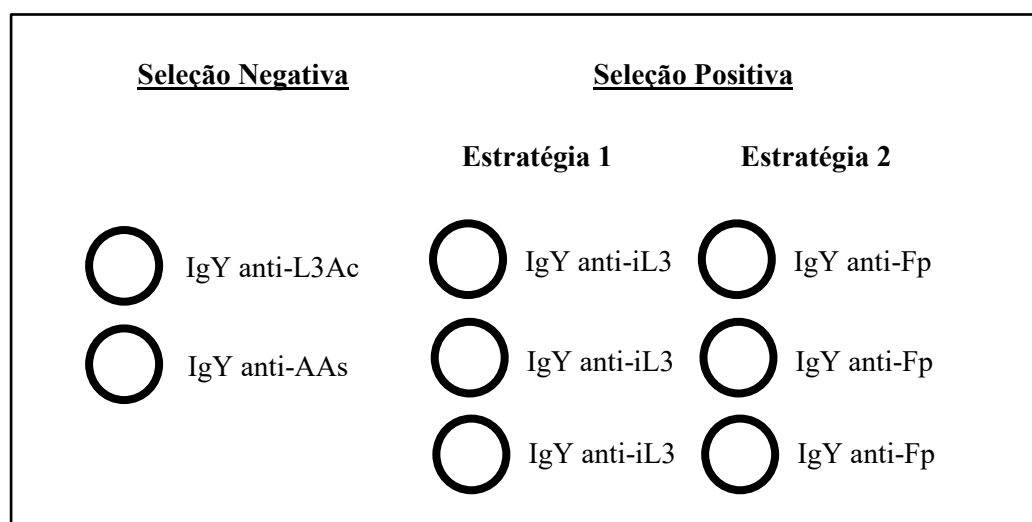


Figura 4 - Estratégias de *biopanning* para a seleção de clones de fagos com peptídeos expressos ligantes das moléculas de IgY fracionadas. A estratégia 1 utilizou os anticorpos IgY anti-iL3, e a estratégia 2 os anticorpos IgY anti-Fp. A seleção negativa aconteceu nas mesmas condições previamente às duas estratégias de seleções positivas. Os clones não ligados nos poços das seleções negativas foram usados na seleção positiva e eluídos de forma competitiva. **iL3** – larva filarioide de *S. venezuelensis*; **Fp** – fêmea partenogênica de *S. venezuelensis*; **L3Ac** – larva filarioides de *A. ceylanicum*; **AAAs** – adulto de *A. suum*.

Após a imobilização dos anticorpos IgY em microplaca, o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com 300 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS 0,1 M, pH 7,4; + BSA 5 %), seguido de incubação por 1 h a 4 °C, sob agitação lenta. Os poços foram lavados por 6 vezes com 300 μ L/poço de PBS-T por um minuto. No primeiro ciclo de seleção foram adicionados 10 μ L (1×10^{11} partículas virais) da biblioteca randômica de fagos com os peptídeos expressos diluídos em 150 μ L de PBS no primeiro poço da seleção negativa (IgY anti-L3Ac). No restante dos poços que não continham a biblioteca de fagos foram adicionados 150 μ L de PBS para evitar o ressecamento dos mesmos durante as etapas de incubação. Após

incubação, por 30 min a 37 °C, o sobrenadante contendo os fagos não ligados foi transferido para o segundo poço de seleção negativa (IgY anti-AAAs). O primeiro ciclo de seleção negativa finalizou após nova etapa de incubação como descrito anteriormente.

A seleção positiva iniciou com a passagem do volume resultante da última etapa de seleção negativa para os primeiros poços contendo os anticorpos específicos ao *S. venezuelensis* (IgY anti-iL3 e anti-Fp). Após nova incubação por 30 min a 37 °C, o sobrenadante foi passado para os segundos poços da seleção positiva. Esse processo se repetiu nas duas estratégias até o terceiro poço contendo os anticorpos IgY alvo. Os sobrenadantes foram então descartados e realizadas cinco lavagens com PBS-T. Os clones de fagos ligados aos anticorpos IgY foram eluídos nos três poços do alvo de cada estratégia de forma competitiva com 150 µL de tampão de eluição (extratos antigênicos utilizados nas imunizações das galinhas a 200 µg/mL em PBS-T) por 30 min, sob agitação lenta, a 37 °C. O primeiro ciclo de seleção de fagos finalizou com a coleta dos volumes dos três poços alvo de cada estratégia.

Uma alíquota de 1µL do eluato final dos primeiros ciclos foi utilizada para a titulação dos fagos resultantes e a parte remanescente foi amplificada, antes de ser submetida ao segundo ciclo do *biopanning*. A amplificação dos clones selecionados foi realizada em 20 mL de meio Luria Bertani (LB - triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L), contendo tetraciclina e uma colônia previamente isolada de *Escherichia coli* linhagem ER2738. Após incubação, sob agitação a 37 °C, para a multiplicação bacteriana até a fase *early-log* ($DO_{600} \sim 0,3$), foram adicionados 500 µL do eluato de fagos selecionados e incubados por cerca de 4-5 horas a 37 °C sob agitação vigorosa. A cultura foi centrifugada (4 °C, 10.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante foi transferido para tubos estéreis contendo solução de PEG/NaCl (20 % polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl) a 1/6 do volume inicial do sobrenadante. Para a precipitação dos fagos a solução foi incubada *overnight* a 4 °C, e posteriormente centrifugada (4 °C, 10.000 rpm, 15 min) para o descarte do sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 1 mL de PBS e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl, durante 1 h em gelo. Após centrifugação (4 °C, 14.000 rpm, 10 min), e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de PBS. Dessa forma foi obtido o eluato amplificado de clones de fagos do primeiro ciclo de seleção, que foi posteriormente titulado e utilizado em dois novos ciclos de seleção nas mesmas condições descritas. Os eluatos finais da última seleção foram transferidos para microtubos e mantidos a 4 °C para as etapas posteriores. Em cada ciclo de seleção foram realizadas titulações dos eluatos.

3.14 – Titulações dos clones de fagos selecionados

A quantidade de partículas virais foi determinada por titulações durante a entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*. Os eluatos foram submetidos a diluições seriadas de 10 vezes em meio LB. Para os eluatos não amplificados de cada ciclo foram empregadas as diluições de 10^{-1} a 10^{-4} , e para os eluatos após amplificação, as diluições de 10^{-8} a 10^{-11} . Em cada diluição foram acrescentados 200 μ L de meio LB com *E. coli* ER2738 amplificadas na fase *mid-log* ($DO_{600} \sim 0,5$) e incubados por 5 minutos a TA. As soluções de bactérias infectadas com os clones de fagos foram transferidas para tubos tipo Falcon, contendo 3 mL de meio Agarose Top (210 mg de Agarose, 600 mg de LB, 30 mg $MgCl_2$) a 45 °C, e evertidas em placas de Petri (uma para cada diluição) contendo meio LB sólido, acrescido de IPTG/X-gal e tetraciclina. As placas foram incubadas a 37 °C, *overnight*. As colônias azuis formadas pela quebra do substrato X-gal e expressão do gene da β -galactosidase pelos fagos foram contadas e multiplicadas pelos fatores de diluição correspondentes para a obtenção do título de fagos.

3.15 – Validação dos clones de fagos selecionados

As colônias azuis formadas pela quebra do substrato X-gal e expressão do gene da β -galactosidase nas placas tituladas do último ciclo do *biopanning* foram coletadas de forma aleatória e transferidas para poços de placa de cultura (*deepwell*) contendo 1,2 mL de cultura de *E. coli* ER2738 em meio LB na fase *early-log* ($DO_{600} \sim 0,3$), sendo cada colônia isolada em um poço específico. A placa foi vedada e incubada a 37 °C, por 24 h, sob agitação (250 rpm). Para isolar os clones de fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas (3.700 rpm, 20 °C, 30 min). Para a precipitação dos clones, 800 μ L dos sobrenadantes de cada poço foram transferidos para outra placa *deepwell*, e incubados por 10 min, com 350 μ L de PEG/NaCl. Após centrifugação (3.700 rpm, 20 °C, 40 min) os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, contendo os fagos reamplificados, foram utilizados nos ensaios de pré-validação.

A pré-validação de cada estratégia de seleção foi realizada para a identificação dos clones de fagos mais relevantes em especificidade aos alvos utilizados. Um total de 96 clones oriundos das colônias formadas da estratégia 1 (IgY anti-iL3) de *biopanning* e de 80 clones da estratégia 2 (IgY anti-Fp) foram avaliados quanto a reatividade com os próprios anticorpos IgY alvo de cada seleção em teste ELISA. Placas de microtitulação de alta afinidade (Greiner BioOne, Austria) foram adsorvidas com anticorpos IgY purificados (anti-iL3 e anti-Fp) nas

mesmas condições do item 3.12. Após seis lavagens com PBS-T, foi realizada a etapa de bloqueio com PBS-T-M 3 % por 1 h a 37 °C. A seguir foi adicionado 100 µL das soluções de cada clone de fagos amplificados em placa *deepwell* e de cultura de fago selvagem (não expressa proteínas exógenas) para o controle da reação. Após etapa de incubação (1 h, 37 °C) e um ciclo de lavagem com PBS-T, o anticorpo secundário anti-M13 conjugado com peroxidase foi adicionado na proporção de 1:5000 diluído em PBS-T-M 1 %. As etapas de incubação do conjugado, lavagem e revelação da reação seguiram as mesmas condições do item 3.8.

Após a seleção dos clones de fagos considerados mais reativos aos anticorpos específicos de cada seleção de *biopanning*, os mesmos foram avaliados em teste ELISA com *pool* de 5 amostras aleatórias de soros de cada grupo descrito no item 3.2. Placas de microtitulação de alta afinidade (Greiner BioOne, Austria) foram sensibilizadas com 1×10^{10} /poço de cada clone selecionado, diluídos em 50 µL de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Foram utilizados sete clones da estratégia 1 (IgY anti-iL3), seis da estratégia 2 (IgY anti-Fp) e como controle negativo da reação, um clone de fago selvagem. Após um ciclo de lavagem (5 min) com PBS-T, os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio (PBS-T-M 3 %) por 1 h a 37 °C. Os poços foram lavados três vezes (5 min cada) com PBS-T e foram adicionados os *pool* de soros diluídos em PBS-T-M 3 %, na proporção de 1:80. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C e em seguida, lavadas como descrito anteriormente. O anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase específico a porção Fc (Sigma-Aldrich, EUA), foi adicionado diluído em PBS-T-M 3 %, na proporção de 1:2000. Após incubação, por 1 h a 37 °C, as etapas de revelação seguiram as descritas no item 3.8. Como controle negativo da reação foi utilizado clone de fago selvagem.

3.16 – Extração e sequenciamento de DNA dos clones de fagos

Os clones de fagos considerados mais relevantes após os ensaios ELISA de pré-validação foram novamente amplificados e purificados como descrito no item 3.17. Após a etapa de precipitação foi adicionado 100 µL de tampão de extração iodeto (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4 M de NaI) para cada clone. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 seg e adicionadas de 250 µL de etanol absoluto. Após incubação por 10 min a T.A., e centrifugação (3.700 rpm, 20 °C, 10 min), os sobrenadantes foram descartados. O precipitado resultante foi lavado com 500 µL de etanol a 70 % e centrifugado novamente nas mesmas condições descritas. Ao final, o DNA precipitado foi adicionado de 20 µL de

água ultrapura, e submetido a avaliação eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com solução de brometo de etídio.

Para o sequenciamento do DNA extraído dos principais clones de fagos, foram utilizados 500 ng de DNA molde, 5 pmol do primer -96 gIII (5' -OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' – Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences, Reino Unido). A reação ocorreu em termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf, EUA) em 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação (95 °C, 20 seg), anelamento do *primer* (50 °C, 15 seg) e extensão (60 °C, 1 min). O DNA sequenciado foi precipitado com 1 µL de acetato de amônio e 27,5 µL de etanol absoluto. A placa foi centrifugada (3.700 rpm, 20 °C, 45 min) e o sobrenadante descartado. Após a adição de 150 µL de etanol 70 %, a placa foi centrifugada (3.700 rpm, 20 °C, 15 min), e o sobrenadante descartado. A placa foi invertida sobre papel toalha e pulsada a 800 rpm durante 1 segundo. Foi então coberta com papel alumínio e deixada por 5 minutos para completa evaporação do etanol. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10 µL de tampão de diluição (DYWnamic ET Dye Terminator Cycle Kit, Amersham Biosciences, Reino Unido).

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático GenomeLab GeXP – Genetic Analysis System (Beckman Coulter – Sciex, EUA) .

3.17 – Análise de bioinformática

As sequências de nucleotídeos codificadoras dos peptídeos expressos na proteína III do capsídeo dos fagos selecionados foram deduzidas *in silico* através da ferramenta *translate* do programa *ExPASy*, (disponível em <http://web.expasy.org/translate/>). Os peptídeos identificados foram comparados quanto às homologias entre os mesmos pelo programa *Clustal Omega* (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

As sequências de aminoácidos identificadas dos peptídeos selecionados foram comparadas, quanto ao grau de similaridade, com sequências de proteínas registradas em banco de dados de *S. stercoralis* pelo programa BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*, (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), utilizando a ferramenta *Protein blast* (BLASTp).

3.18 – Amplificação e purificação dos clones de fagos mais relevantes

Após os ensaios de pré-validação, sequenciamento de DNA e análise de bioinformática, os clones de fagos considerados mais relevantes em especificidade foram amplificados em Erlenmeyer, para a obtenção de volume necessário para a aplicação no ensaio imunoenzimático (*phage*-ELISA) com soros de pacientes com strongiloidíase. Foram utilizados 20 µL da suspensão estocada de cada clone de fago considerado relevante em placa de *backup* para o início da amplificação. O volume foi transferido para Erlenmeyer contendo 100 mL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase early-log (DO 600 ~ 0,3) adicionado de tetraciclina. As culturas foram incubadas a 37 °C, *overnight*, sob agitação vigorosa (250 rpm). Foram posteriormente centrifugadas (4.000 rpm, 4 °C, 10 min). O sobrenadante foi coletado e adicionado de PEG/NaCl a 1/6 do volume, incubado em repouso a 4 °C, *overnight*, e centrifugado (10.000 rpm, 4 °C, 10 min) para a precipitação dos clones. Ao *pellet* foi adicionado 100 µL de PBS, para posterior quantificação de fagos em espectrofotômetro. As suspensões quantificadas foram estocadas a 4 °C, até a utilização no ensaio *phage*-ELISA, com as amostras de soros de pacientes com strongiloidíase.

3.19 – Aplicação dos clones de fagos selecionados no diagnóstico sorológico da strongiloidíase por *phage*-ELISA

As estratégias de *biopanning* empregadas geraram um total de seis clones de fagos considerados relevantes, específicos ao alvo e com sequência de aminoácidos conhecida, sendo três para cada método de seleção (IgY anti-iL3 e anti-Fp). Após a amplificação e dosagem dos clones, os mesmos foram avaliados quanto a aplicação no diagnóstico sorológico de pacientes com strongiloidíase por meio do teste *phage*-ELISA. Os clones foram utilizados para a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* nos grupos de amostras de soros descritos no item 3.2. Os testes foram realizados em placas de microtitulação de alta afinidade (Greiner BioOne, Áustria) que foram previamente sensibilizadas com cada clone selecionado e com um clone inespecífico (selvagem) na concentração de 1×10^{10} ufc/poço, diluídos em 50 µL de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Após um ciclo de lavagem (5 min) com PBS-T, os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200 µL de tampão de bloqueio (PBS-T-M 3 %) por 1 h a 37 °C. Os poços foram lavados três vezes (5 min) com PBS-T e adicionados das amostras de soro de pacientes com strongiloidíase, saudáveis e com outras parasitoses, diluídas em PBS-T-M 3 %, na proporção de 1:80. As placas foram

incubadas por 1 h a 37 °C e em seguida lavadas como descrito anteriormente. O anticorpo secundário, anti-IgG humana conjugado com peroxidase específico a porção Fc (Sigma-Aldrich, EUA), foi diluído em PBS-T-M 3 % na proporção de 1:2000, e adicionado para incubação por 1 h a 37 °C. As etapas de revelação e análise dos resultados foram realizadas conforme às descritas no item 3.12. Como controle negativo da reação foi utilizado clone de fago selvagem.

3.20 - Normas de biossegurança

Os procedimentos 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).

3.21 – Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa computacional GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc. EUA). Os valores de DO das amostras de soro em cada grupo de pacientes foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo pós-teste de Dunn ($P < 0,05$), em todos os ensaios de diagnóstico sorológico. Os valores diagnósticos de sensibilidade (Se), especificidade (Es), razão de verossimilhança positiva (RR+) e negativa (RR-) foram calculados de acordo com as fórmulas: $Se (\%) = a \times 100 / (a + c)$; $Es (\%) = d \times 100 / (b + d)$; $RR+ = Se / (1 - Es)$; $RR- = 1 - Se / Es$, onde a: verdadeiro positivo; b: falso positivo; c: falso negativo; d: verdadeiro negativo. A área sob a curva (ASC) foi obtida pelos valores da curva ROC (*receiver operating characteristic curve*) para a determinação da acurácia diagnóstica de cada método. As áreas sob as curvas geradas em cada teste de diagnóstico foram comparadas entre os testes de detecção de imunocomplexos, pelos anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp; e entre os testes de *phage*-ELISA envolvendo os clones de fagos de cada estratégia de *biopanning* de acordo com DeLong *et al.* (1988). As análises empregadas consideraram intervalos de confiança (IC) de 95 %.

4. RESULTADOS

4.1 – Preparação antigênica

A qualidade da preparação dos extratos antigênicos totais das três espécies de parasitos utilizadas foi avaliada por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %). As bandas polipeptídicas foram evidenciadas pela coloração com *Coomassie Brilliant blue* G-250 (Sigma-Aldrich, EUA) (Fig. 5). Depois de confirmado o processo de produção antigênica, a concentração proteica foi mensurada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Os preparados antigênicos apresentaram os seguintes rendimentos de proteínas: larvas filarioides de *S. venezuelensis* (7.500 µg/mL); fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* (8.500 µg/mL); larvas filarioides de *A. ceylanicum* (5.000 µg/mL) e adultos de *A. suum* (9.000 µg/mL). Após a dosagem proteica os E.A. foram utilizados nos protocolos de imunizações das galinhas.

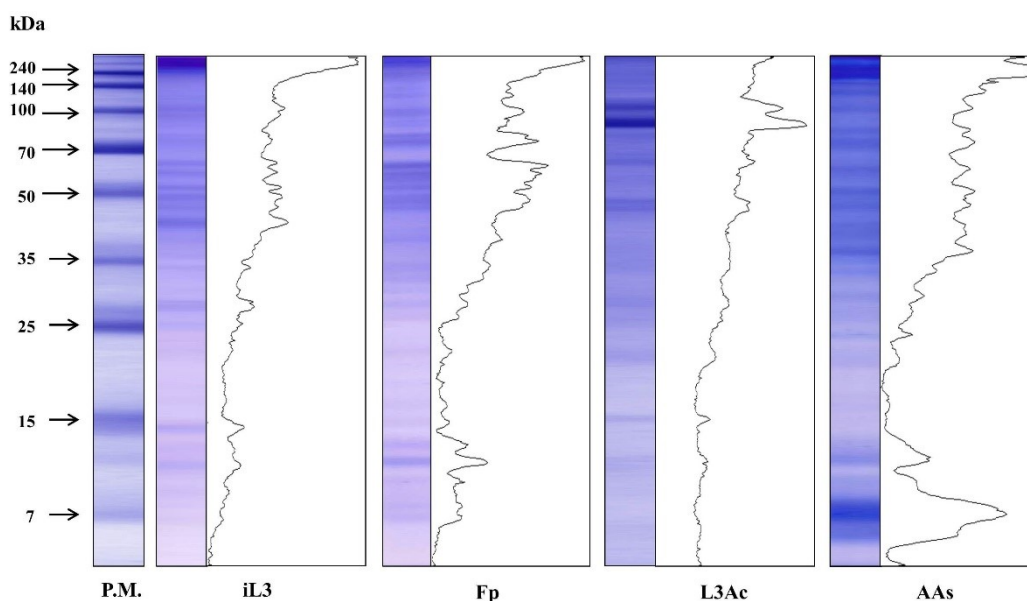


Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %) dos extratos antigênicos salinos totais utilizados nos protocolos de imunizações das galinhas. P.M. – padrão de peso molecular RECOM BLUE Wide Range Protein Marker (Real Biotech, Taiwan); **iL3** – larvas filarioides de *S. venezuelensis*; **Fp** – fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*; **L3Ac** – larvas filarioides de *A. ceylanicum*; **AAs** – adulto de *A. suum*. kDa – kilodaltons

4.2 – Acompanhamento das imunizações e obtenção de ovos e soro das galinhas

As galinhas imunizadas de todos os grupos mantiveram a postura de ovos regular durante todas as semanas do experimento (6 a 12 ovos/semana/grupo). Não foram evidenciados processos inflamatórios locais derivados das imunizações. O volume médio do conteúdo das gemas foi de aproximadamente 10 mL por ovo. A parte experimental com as galinhas teve duração de 11 semanas (77 dias), sendo a primeira semana, antes da primeira imunização. Antes disso, as galinhas foram alojadas nas gaiolas, duas semanas antes do início do acompanhamento experimental, para aclimação dos animais.

4.3 – Fracionamento dos anticorpos IgY provenientes das gemas

A primeira etapa do processo de fracionamento dos anticorpos IgY aconteceu com a retirada da fração lipídica das gemas, que foi precipitada (P1), resultando na formação de um sobrenadante translúcido rico em proteínas (S1). A segunda etapa ocorreu por meio da precipitação de proteínas do sobrenadante formado na primeira etapa. A adição de sulfato de amônio permitiu a formação de um *pellet* de cor branca (P2), rico em anticorpos IgY que foi utilizado na última etapa do processo de purificação. O sobrenadante (S2) obtido da segunda etapa foi descartado (Fig. 6). Cada mililitro de gema purificada rendeu aproximadamente 5-6 mg de proteínas precipitadas ao final da segunda etapa (Fig. 7). A terceira etapa do processo ocorreu pela purificação das moléculas de IgY por cromatografia de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA Prime (GE Healthcare, EUA). A cada corrida cromatográfica foi aplicado 1 mL de amostra rica em anticorpos IgY, concentrada e dialisada (10.000 µg/mL), que gerou 15 tubos/frações (nº 35-50) ricas em anticorpos IgY de 1 mL cada (Fig. 8). O rendimento médio de anticorpos IgY após cada corrida foi de 3,5-4,5 mg. Após cada ciclo cromatográfico, alíquotas de 10 µL das amostras obtidas foram submetidas a ensaios *dot-blot*, em membranas de nitrocelulose para a confirmação da presença de moléculas de IgY (dados não apresentados). Todas as amostras obtidas revelaram a presença das moléculas de IgY, confirmando o protocolo de fracionamento.

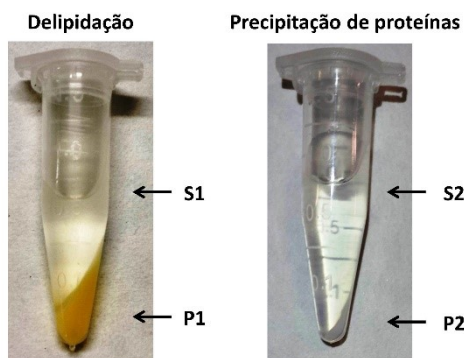


Figura 6 - Etapas de purificação dos anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos das galinhas imunizadas. **Etapa 1:** Delipidação pela adição de água ultrapura acidificada. **S1** – Fração solúvel rica em proteínas; **P1** – precipitado rico em lipídeos. **Etapa 2:** Precipitação de proteínas com sulfato de amônio 20 % m/v. **S2** – sobrenadante descartado; **P2** – *pellet* rico em anticorpos IgY resultantes da precipitação proteica

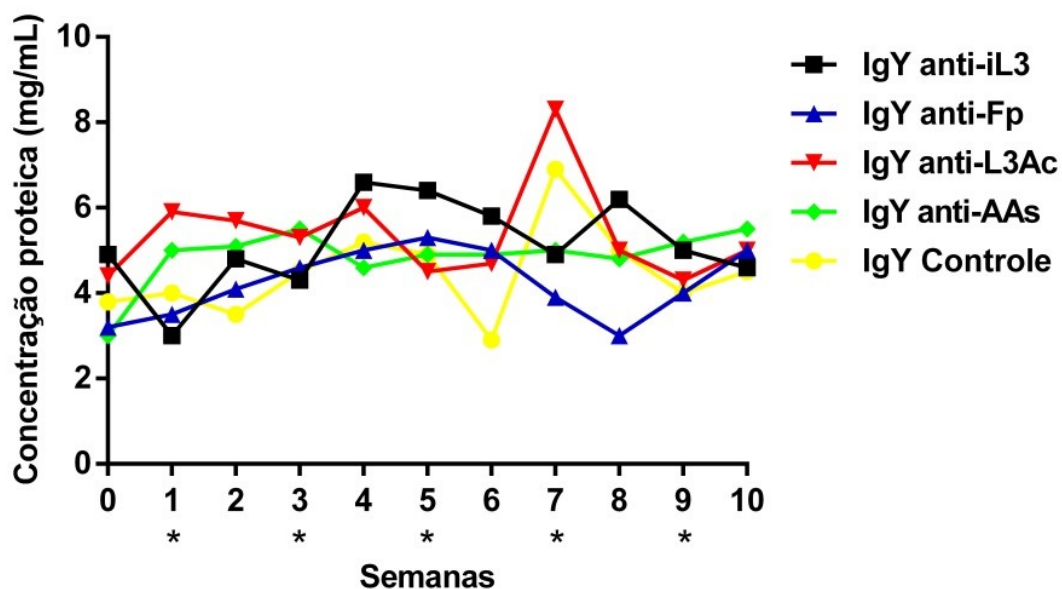


Figura 7 - Concentração proteica em mg/mL das amostras de IgY provenientes de gemas, após o processo de precipitação proteica (**P2**) com sulfato de amônio 20 % m/v. A dosagem de proteínas foi realizada em espectrofotômetro (UV-Vis Biodrop μ Lite, Reino Unido) a 280 nm. *- Imunizações. **iL3** – larvas filarioides de *S. venezuelensis*; **Fp** – fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*; **L3Ac** – larvas filarioides de *A. ceylanicum*; **AAs** – adultos de *A. suum*

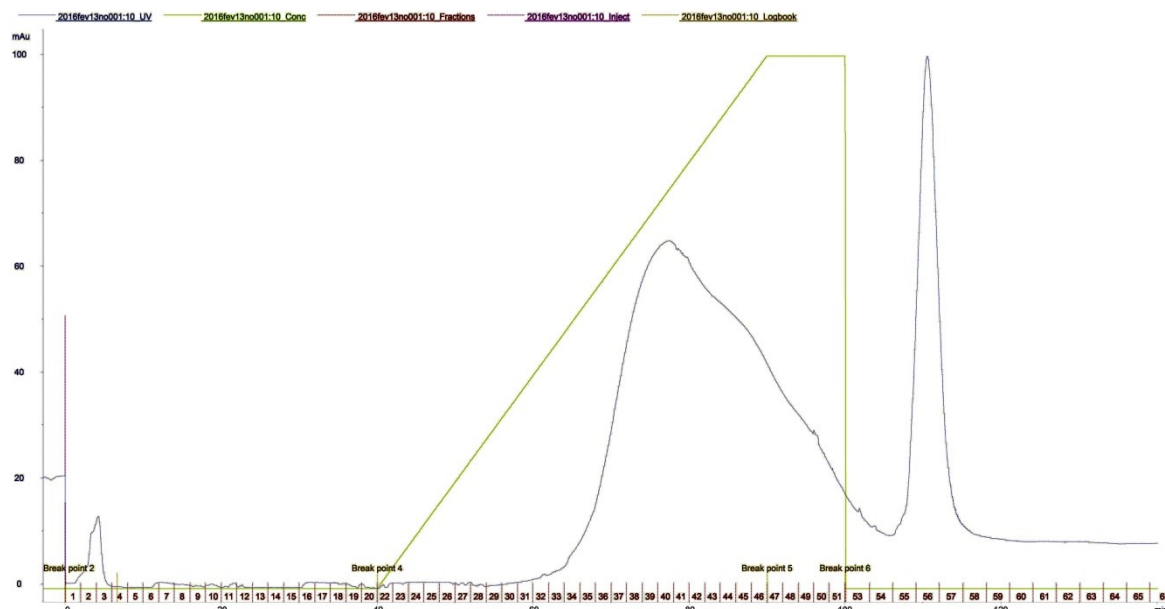


Figura 8 – Cromatograma resultante do fracionamento das moléculas de IgY. O pico de eluição das moléculas de IgY eluídas na coluna cromatográfica corresponde às frações/tubos 35 a 50 de 1 mL cada. As amostras correspondentes ao primeiro pico de eluição foram coletadas e utilizadas nas etapas posteriores. O segundo pico de eluição (frações/tubos 55-57) é correspondente a separação de ovoalbumina, que foi posteriormente descartado.

A qualidade do processo de fracionamento dos anticorpos IgY foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (SDS-PAGE 12 %). Todas as soluções resultantes das três etapas do protocolo foram avaliadas nas mesmas condições. Amostras da solução de gemas com água ultrapura (G), precipitado rico em lipídeos (P1), fração solúvel rica em proteínas (S1), *pellet* rico em anticorpos IgY (P2), sobrenadante descartado (S2) e das frações após a cromatografia de afinidade (F) foram submetidas a eletroforese. O tratamento prévio das amostras com 2-mercaptoethanol 5 % promoveu a quebra das pontes dissulfeto entre as cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas Y. A presença das cadeias pesadas (65 kDa) e leves (22-24 kDa) foram comprovadas principalmente nas soluções P2 e P, com o destaque para a ocorrência de apenas moléculas de IgY após a etapa de purificação por cromatografia de afinidade (P) (Fig. 9).

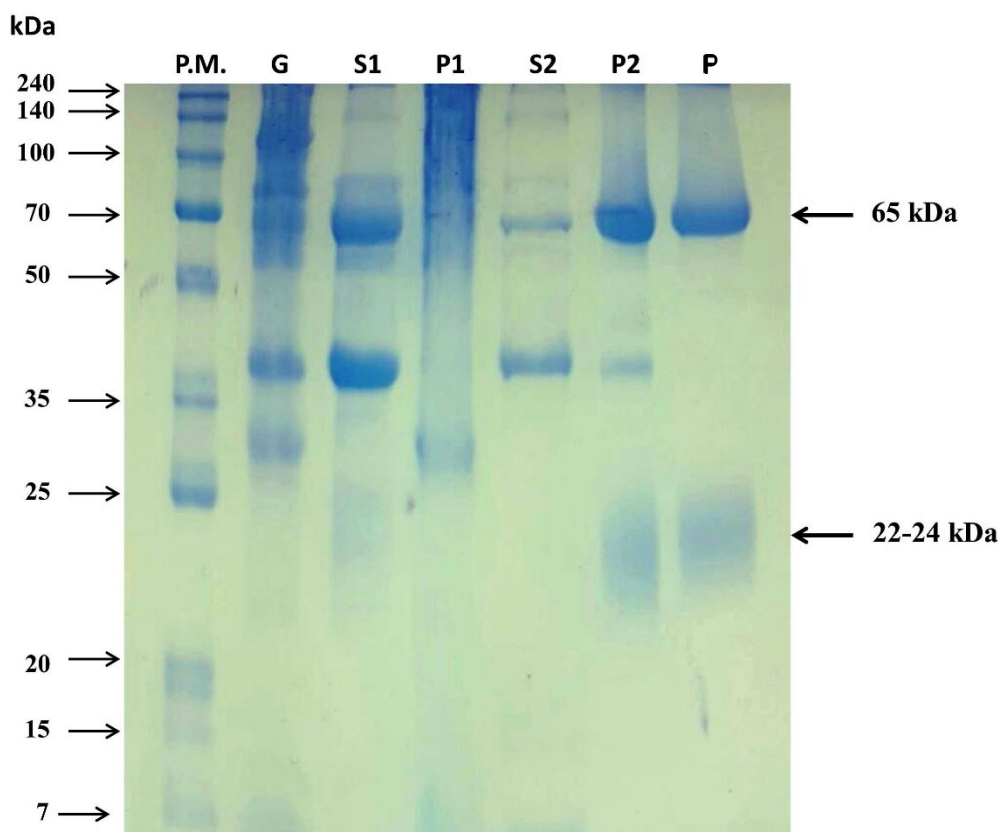


Figura 9 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12 %, sob condições redutoras, das etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY. **G** – solução de gemas prévia ao protocolo de fracionamento; **S1** – sobrenadante rico em proteínas; **P1** – precipitado rico em lipídeos; **S2** – sobrenadante descartado após a precipitação proteica; **P2** – *pellet* rico em anticorpos IgY após precipitação com sulfato de amônio 20 % m/v; **P** – frações obtidas após cromatografia de afinidade. São evidenciadas as cadeias pesadas (65 kDa) e leves (22-24kDa) das moléculas de IgY na gema total (G), na fração solúvel S1, precipitado P2 (etapa de purificação das proteínas), e nas amostras purificadas em sistema completo de cromatografia (P). P.M. - padrão de peso molecular RECOM BLUE Wide Range Protein Marker, (Real Biotech, Taiwan). kDa – kilodaltons.

4.4 – Caracterização dos anticorpos IgY

Após a confirmação do processo de fracionamento dos anticorpos IgY, os mesmos foram avaliados quanto a especificidade aos alvos. A cinética de produção dos anticorpos específicos foi avaliada pelo teste ELISA indireto (Fig. 10). Foram utilizadas as amostras semanais fracionadas provenientes das gemas e amostras de soros obtidas quinzenalmente. Nas amostras provenientes das gemas, a partir da terceira semana, foram detectados valores de IE > 1,0 para os anticorpos IgY anti-iL3. Na segunda semana foram observados valores de IE > 1,0 para os anticorpos IgY anti-Fp e anti-AAAs. Os anticorpos IgY anti-L3Ac apresentaram valores de IE > 1,0 a partir da quarta semana. Após a segunda imunização houve um aumento gradual da conversão de anticorpos IgY para as gemas em todos os grupos analisados, que se estabilizaram a partir da quinta e sexta semana de acompanhamento. Nas amostras de soro os valores de IE > 1,0 ocorreram a partir da quarta semana, ou seja, após a segunda imunização das galinhas em todos os grupos estudados (Fig. 10).

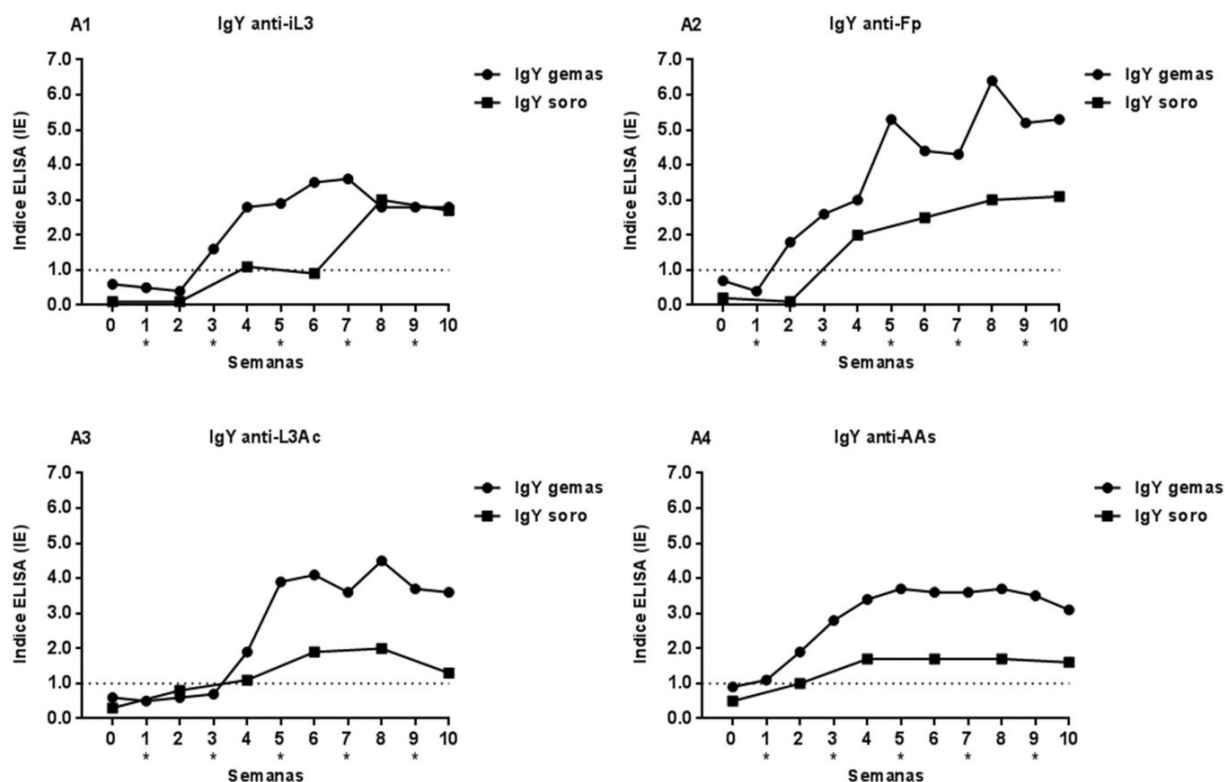


Figura 10 - Cinética de produção de anticorpos IgY específicos. A produção dos anticorpos foi monitorada por 10 semanas a partir da primeira imunização e avaliada semanalmente em amostras purificadas das gemas e quinzenalmente em amostras de soro em alternância com as semanas das imunizações. Semana 0 – pré-imunização. *- Imunizações. **A1** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (iL3); **A2** – IgY específica a antígenos de fêmea partenogenética de *S. venezuelensis* (Fp); **A3** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *A. ceylanicum* (L3Ac); **A4** – IgY específica a antígenos de adultos de *A. suum* (AAs). Valores positivos quando o Índice ELISA > 1,0

O cálculo da avidéz dos anticorpos IgY produzidos foi realizado por meio do teste ELISA indireto com as amostras purificadas provenientes das gemas das semanas que apresentaram $IE > 1,0$. Após o tratamento dos imunocomplexos (IgY + antígenos) com ureia 6 M, os anticorpos IgY anti-iL3 apresentaram índices avidéz variando de 68,0 % a 82,8 %, com maiores valores nas semanas 6 (82,8 %) e 10 (82,7 %). Os anticorpos IgY anti-Fp resultaram em índices variando de 74,0 % a 95,4 % (semana 8), IgY anti L3Ac de 42,5 % a 61,3 % (semana 10) e os anticorpos IgY anti-AAs de 70,7 % a 98,6 % (semana 8) (Fig. 11).

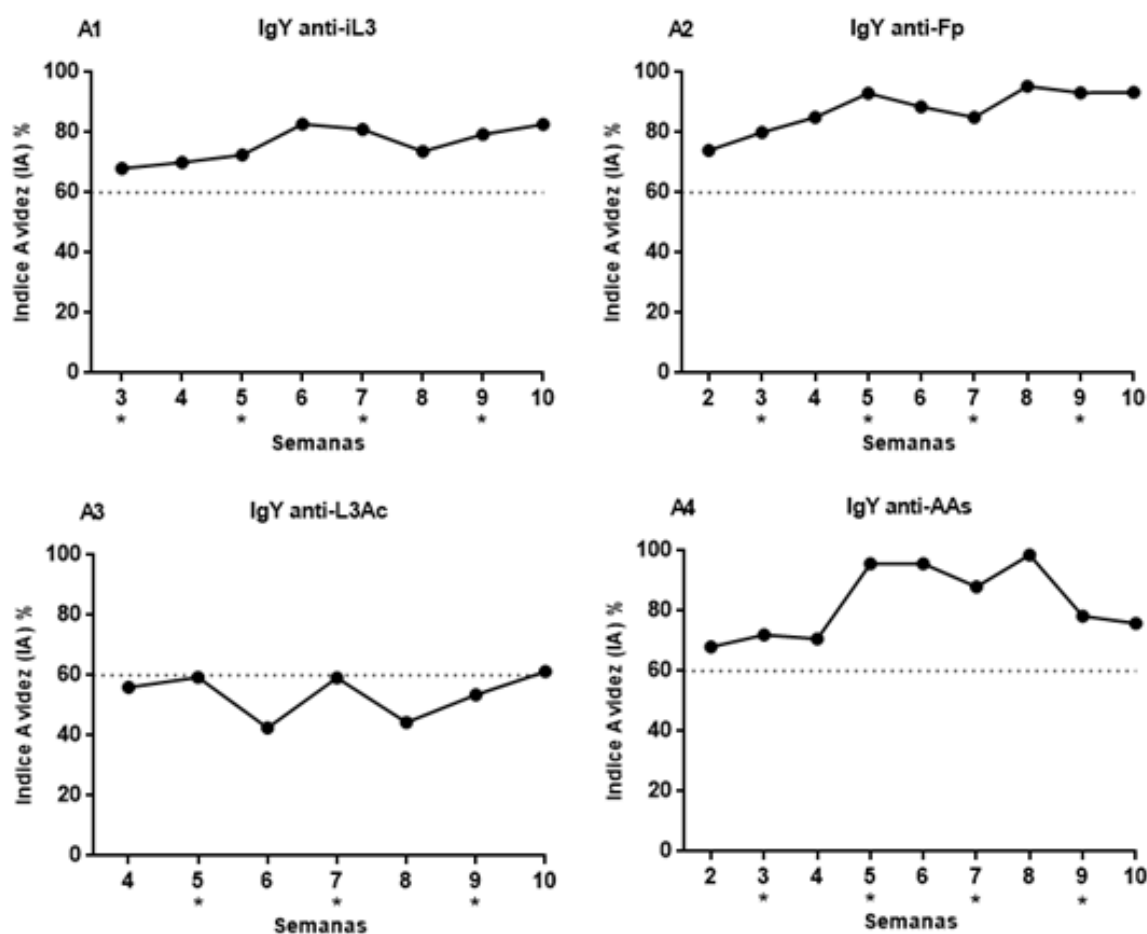


Figura 11 – ELISA avidéz dos anticorpos IgY purificados e tratados com ureia 6 M. Os índices avidéz (I.A. %) foram calculados para as semanas que apresentaram Índice ELISA > 1,0 no ensaio de cinética de produção de anticorpos específicos. *- Imunizações. **A1** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (iL3); **A2** – IgY específica a antígenos de fêmea partenogenética de *S. venezuelensis* (Fp); **A3** – IgY específica a antígenos de larvas filarioides de *A. ceylanicum* (L3Ac); **A4** – IgY específica a antígenos de adultos de *A. suum* (AAs).

Os anticorpos IgY produzidos contra os E.A. de *S. venezuelensis* (IgY anti-iL3 e anti-Fp) foram avaliados no reconhecimento de bandas polipeptídicas de seus respectivos E.A., usados nas imunizações, pelo ensaio *Immunoblotting* (Fig. 12) e em cortes histológicos crio-seccionados de larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* por meio de ensaios de imunofluorescência indireta (Fig. 13).

Nos ensaios *Immunoblotting* os anticorpos IgY anti-iL3 fracionados da semana com maior índice ELISA (semana 7) reconheceram bandas polipeptídicas com peso molecular aproximado nas regiões de >140, 100, 85, 73, 50, 44, e 34-25 kDa do E.A. de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Os anticorpos IgY anti-Fp purificados (semana 8)

demonstraram especificidade no reconhecimento de bandas polipeptídicas com peso molecular aproximado de 240, 140, 120, 60 e 32 kDa do EA de fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* (Fig. 12).

Os anticorpos específicos demonstraram potencial de reconhecimento em ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI) devido a diferença observada na emissão de fluorescência das diferentes formas evolutivas de *S. venezuelensis*, quando comparados com os cortes histológicos de formas metacestódeas de *T. solium* (controle negativo) (Fig. 13). Em ambos os ensaios, os anticorpos IgY reconheceram estruturas tegumentares e internas dos parasitos, em contraste com o controle, no qual não foram evidenciadas marcações.

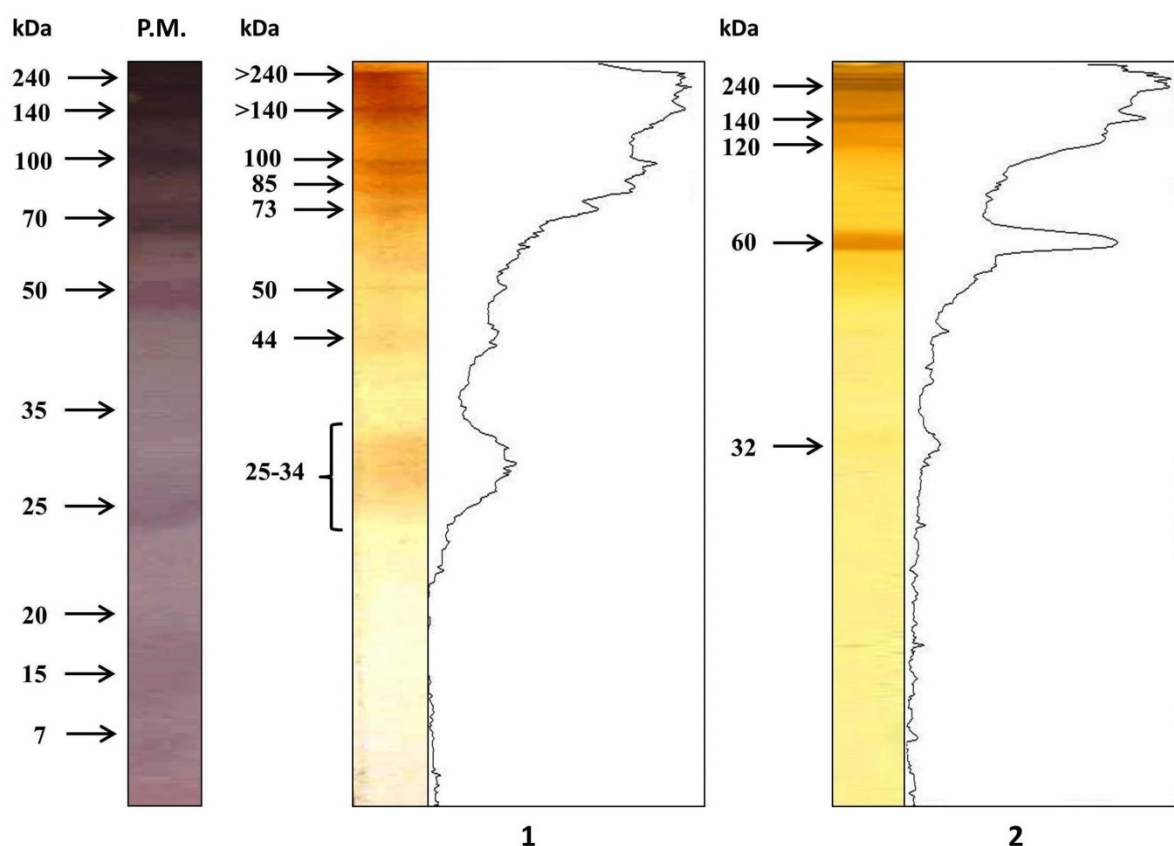


Figura 12 - *Immunoblotting* evidenciando o reconhecimento de bandas polipeptídicas dos extratos antigênicos de *S. venezuelensis*. **1** – Antígeno de larvas filarioides (iL3) incubados com anticorpos IgY anti-iL3; **2** – Antígeno de fêmeas partenogenéticas (Fp) incubados com anticorpos IgY anti-Fp. P.M. – padrão de peso molecular. A marcação das bandas foi analisada pelo programa computacional Image J 1.48. kDa – kilodaltons

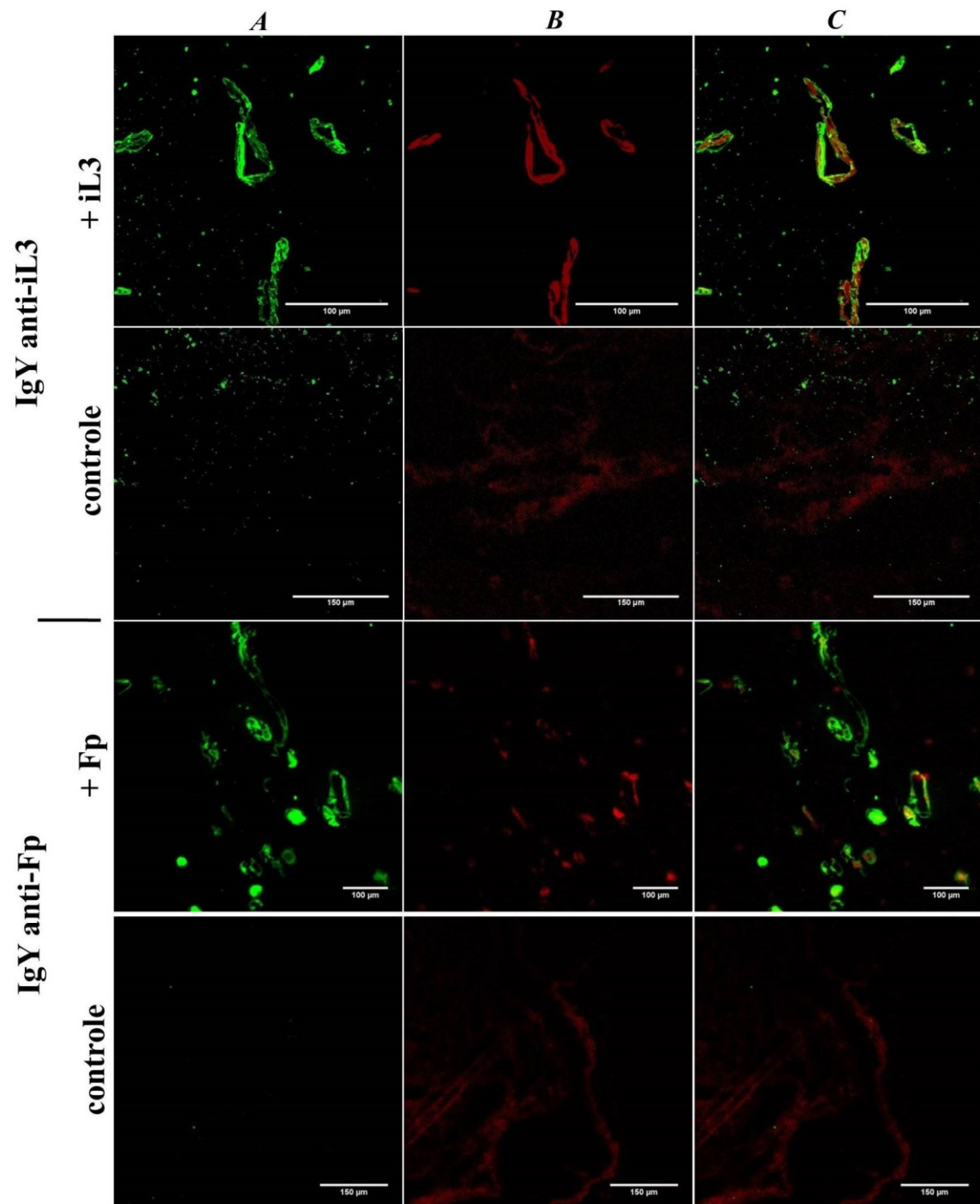


Figura 13 - Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando anticorpos IgY purificados em cortes histológicos de *S. venezuelensis* (iL3 – larvas filarioides; Fp – fêmeas partenogenéticas) ou controle negativo de marcação (formas metacestodeas de *T. solium*). Coluna **A** (verde): Anti-IgY conjugado com FITC; **B** (vermelho): Contracoloração com azul de Evans; **C** (*merged*): das colunas A com a B

4.5 – Aplicações dos anticorpos IgY no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

Os anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp foram aplicados no reconhecimento de imunocomplexos formados por moléculas de IgG sérica e antígenos parasitários, em testes ELISA sanduíche. Os dois testes diagnósticos ocorreram nas mesmas condições, com exceção dos anticorpos IgY utilizados. Os valores de IE entre os grupos de soro de pacientes apresentaram diferença significativa para os dois anticorpos produzidos (anti-iL3 - $H = 82,67$; $P < 0,001$) e (anti-Fp - $H = 85,65$; $P < 0,001$). Nos dois testes diagnósticos empregados o pós-teste de Dunn evidenciou diferença estatística apenas na comparação dos valores de IE do grupo positivo com os do grupo de indivíduos saudáveis e com outras parasitoses ($P < 0,001$) (Fig. 14, A1 e B1). Amostras de soro que apresentaram $IE > 1,0$ foram consideradas positivas.

Utilizando os anticorpos IgY anti-iL3 para o diagnóstico sorológico, a presença de imunocomplexos foi detectada em 95,56 % (43/45) das amostras de soro dos pacientes com estrogiloidíase confirmada; 6,67 % (3/45) dos indivíduos saudáveis; e 15,56 % (7/45) dos pacientes com outras parasitoses, sendo: 3/45 (6,67 %) ancilostomatídeos; 1/45 (2,22 %) *S. mansoni*; 1/45 (2,22 %) *Taenia* sp.; 1/45 (2,22 %) *A. lumbricoides* e 1/45 (2,22 %) *E. histolytica/dispar*. Os valores diagnósticos de sensibilidade e especificidade foram 95,56% (84,85-99,46 %, 95 % IC) e 88,89 % (80,51-94,54 %, 95 % IC) respectivamente no *cut-off* selecionado. A *performance* do teste indicada pela área sob a curva (ASC) foi de 0,967 (0,942-0,993, 95 % IC). A RP^+ de 8,60 indicou uma probabilidade moderada de resultado verdadeiro positivo para estrogiloidíase. A RP^- de 0,05 demonstrou elevado e conclusivo decréscimo na probabilidade da doença (Fig. 14, A2).

Os anticorpos IgY anti-Fp detectaram imunocomplexos em 95,56 % (43/45) das amostras de soro dos pacientes com estrogiloidíase confirmada; 6,67 % (3/45) dos indivíduos saudáveis; e 11,11 % (5/45) dos pacientes com outras parasitoses, sendo: 2/45 (4,44 %) ancilostomatídeos; 1/45 (2,22 %) *S. mansoni*; 1/45 (2,22 %) *Taenia* sp.; 1/45 (2,22 %) *E. histolytica/dispar*. Os valores de sensibilidade, especificidade e ASC foram respectivamente, 95,56 % (84,85-99,46 %, 95 % IC), 91,11 % (82,23-96,08 %, 95% IC) e 0,972 (0,948-0,997 95 %, IC). A RP^+ de 10,75 indicou elevada e conclusiva probabilidade de resultados verdadeiros positivos para estrogiloidíase e a RP^- de 0,05 indicou elevado e conclusivo decréscimo na probabilidade da doença (Fig. 14, B2). As áreas sob as curvas obtidas pelas curvas ROC de ambos os testes diagnósticos foram comparadas pelo método de DeLong *et al.* (1988), que não demonstrou diferença estatística (diferença entre ASC = 0,0049; $z = 1,307$, $P = 0,1911$; IC 95 % -0,0025-0,0123).

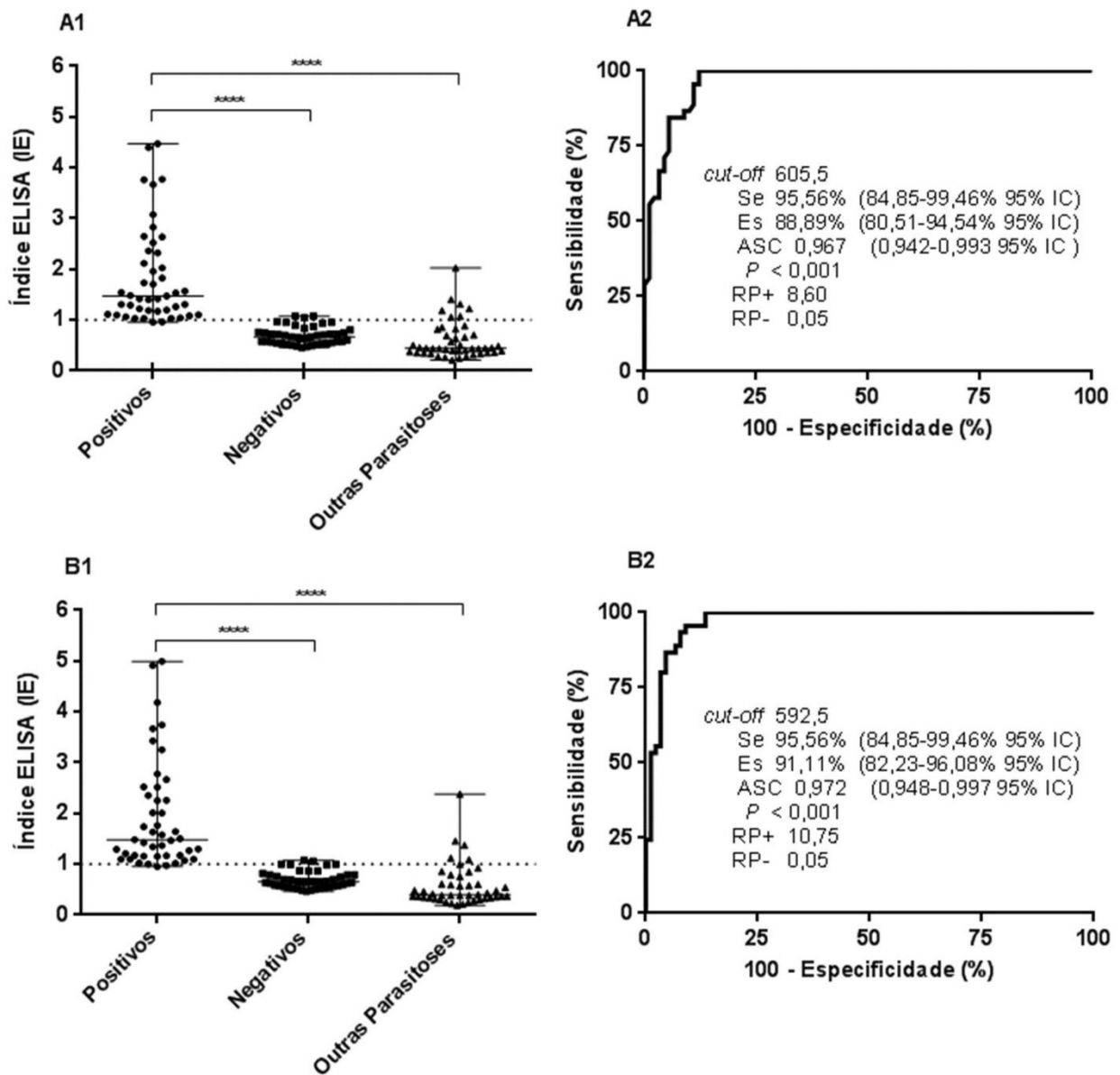


Figura 14 – ELISA sanduíche para a detecção de imunocomplexos utilizando anticorpos IgY específicos (**A.** IgY anti-iL3 ou **B.** IgY anti-Fp) em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase confirmada ($n = 45$), indivíduos saudáveis ($n = 45$) e com outras parasitoses ($n = 45$); **1.** ****- Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,0001$); **2.** Receiver operating characteristic curves (curva ROC) indicando, valores de cut-off, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC) e razões de probabilidades (RP+ e RP-), intervalo de confiança (IC 95 %).

4.6 – Seleção de fagos com peptídeos fusionados ligantes dos anticorpos IgY produzidos

A seleção de fagos com peptídeos ligantes das moléculas de IgY produzidas identificou 3 clones de cada estratégia de *biopanning* aplicada após as etapas de verificação de especificidade e sequenciamento. Todos os clones selecionados passaram pelos ciclos de seleção negativa utilizando os anticorpos IgY inespecíficos (anti-L3Ac e anti-AAs) e foram eluídos da seleção positiva de cada anticorpo IgY específico ao *S. venezuelensis* (anti-iL3 a anti-Fp).

As titulações dos clones de fagos foram eficientes em todos os ciclos de seleção empregados. Todas as etapas de pré-amplificação e pós-amplificação dos fagos apresentaram a formação de colônias azuis pela quebra do substrato X-gal e consequente expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, que tiveram o DNA dos clones incorporados ao próprio. Os títulos de entrada (fagos amplificados) e de saída (fagos não amplificados) estão demonstrados na Tabela 2. O valor de entrada do 1º ciclo corresponde ao número de partículas virais da biblioteca randômica original utilizada na primeira etapa de seleção. Os valores de entrada no 2º e 3º ciclos correspondem aos eluatos amplificados obtidos no 1º e 2º ciclo, respectivamente. Os eluatos foram amplificados para a obtenção de uma quantidade suficiente de partículas virais para a entrada nos ciclos subsequentes. Os títulos de entrada nos ciclos do *biopanning* foram maiores em ambas as estratégias realizadas que os títulos de saída, pois uma parte dos peptídeos dos clones se ligaram aos anticorpos IgY da seleção negativa ou foram removidos durante as etapas de lavagem.

Tabela 2 - Títulos de fagos (ufc) fusionados a peptídeos ligantes aos anticorpos IgY específicos a *S. venezuelensis* (anti-iL3 e anti-Fp) em cada ciclo de seleção do *biopanning* por imunoafinidade.

Ciclos de seleção/Estratégia	Número de partículas de fagos (ufc)		
		Entrada	Saída
Estratégia 1 - IgY anti-iL3			
1º	Biblioteca Original	1×10^{11}	1×10^5
2º	Fagos do 1º ciclo	3×10^{10}	6×10^4
3º	Fagos do 2º ciclo	4×10^{10}	5×10^4
Estratégia 2 - IgY anti-Fp			
1º	Biblioteca Original	1×10^{11}	9×10^4
2º	Fagos do 1º ciclo	3×10^{10}	4×10^4
3º	Fagos do 2º ciclo	2×10^{10}	11×10^4

*Os valores de título de saída correspondem ao eluato não amplificado dos ciclos 1, 2 e 3. ufc: unidade formadora de colônias.

Foram selecionados 96 clones de fagos da estratégia 1 de *biopanning* e 80 clones da estratégia 2 provenientes das colônias bacterianas do último ciclo de seleção para os ensaios de pré-validação. Os clones foram avaliados quanto à especificidade aos alvos de seleção e na aplicação para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana por meio de testes *phage*-ELISA. No primeiro ensaio, envolvendo a reatividade dos clones com os anticorpos IgY específicos, foram selecionados na estratégia 1 (IgY anti-iL3), 10 clones (B5, C10, C12, D4, D5, F3, F4, G2, G3 e H1) com maiores valores de absorbância, acima da média dos demais analisados. Na estratégia 2 (IgY anti-Fp) foram selecionados 8 clones (A7, A9, C10, E3, E4, E5, F8 e G7) com maiores valores de absorbância (Fig. 15).

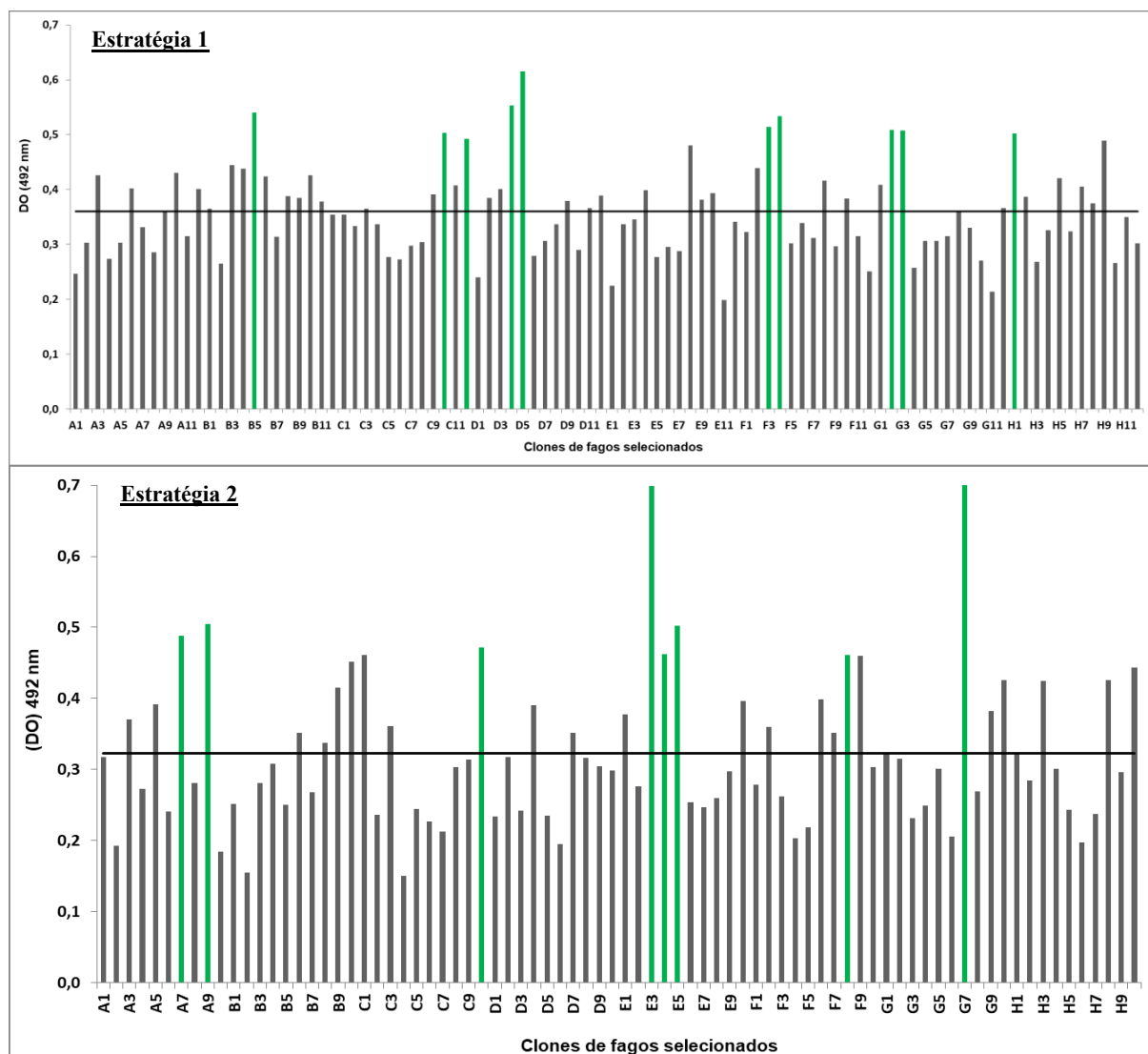


Figura 15 – Validação dos clones de fagos selecionados após as duas estratégias de *biopanning* empregadas (1- IgY anti-iL3 e 2- IgY anti-Fp) por *phage*-ELISA. A reatividade de cada clone de fago foi avaliada pela incubação com a IgY alvo. Em destaque (verde) os clones com maiores valores de DO, considerados mais específicos aos respectivos anticorpos IgY. DO – Densidade óptica a 492 nm.

Os clones selecionados das duas estratégias de *biopanning* foram avaliados no reconhecimento de anticorpos IgG em ensaio ELISA com *pool* de cinco amostras de soro de pacientes aleatórios dos grupos positivos para *estrongiloidíase*, indivíduos saudáveis e com outras parasitoses e comparados com um clone de fago inespecífico (selvagem) nas mesmas condições. O clone de fago selvagem utilizado apresentou reatividade menor que os clones obtidos das duas estratégias empregadas, comprovando a especificidade dos mesmos. Todos os clones selecionados foram mais reativos quando incubados com o *pool* de soros de

pacientes com *estrongiloidíase* confirmada do que com o *pool* de soros dos indivíduos saudáveis ou com outras parasitoses (Fig. 16).

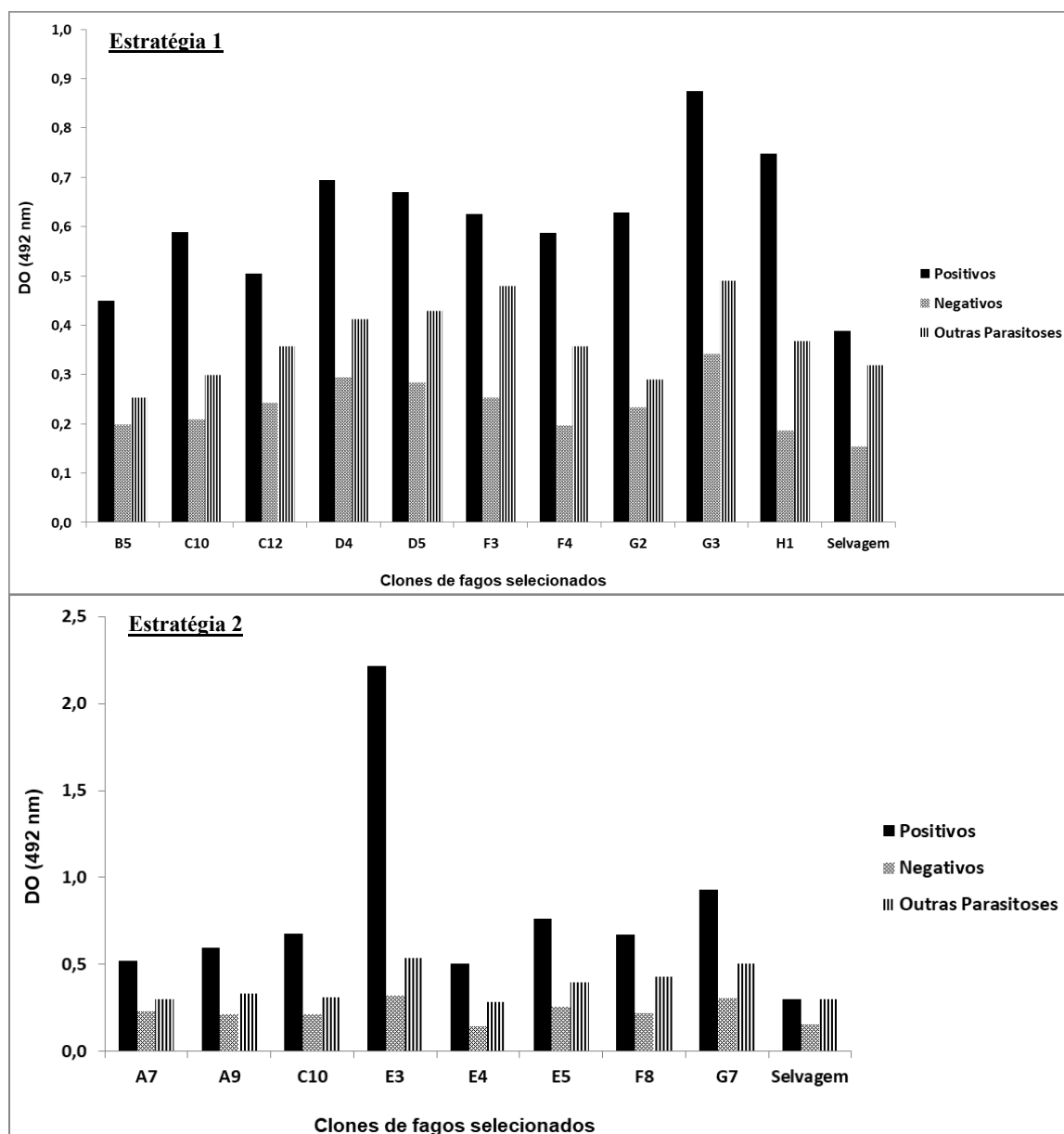


Figura 16 – Validação dos clones de fagos selecionados nas duas estratégias de *biopanning* empregadas (1- IgY anti-iL3 e 2- IgY anti-Fp) por *phage*-ELISA para o imunodiagnóstico da *estrongiloidíase* humana. Foram utilizados *pool* de soros aleatórios dos três grupos de indivíduos: **Positivos** – pacientes com *estrongiloidíase* confirmada; **Negativos** – indivíduos saudáveis; **Outras Parasitoses** – pacientes portadores de outras doenças parasitárias. Um clone de fago irrelevante (*selvagem*) foi utilizado nas mesmas condições como controle de especificidade. DO – Densidade óptica a 492 nm.

Após a confirmação da especificidade dos fagos pré-validados, os clones passaram pelo processo de extração de DNA. Confirmado o protocolo de extração pela análise em gel de agarose a 0,8 %, o DNA dos clones foi submetido ao sequenciamento. Os 10 clones selecionados da estratégia 1 e os 8 clones da estratégia 2 foram analisados, porém apenas três clones de cada estratégia apresentaram sequências de aminoácidos válidas (estratégia 1 – C12, D4 e F4; estratégia 2 – E4, E5 e F8) (Tabela 3). Os clones não sequenciados apresentaram erros nas sequências iniciadoras e finalizadoras ou não apresentavam a quantidade de aminoácidos característica da biblioteca de bacteriófagos M13 utilizada. Nenhuma das sequências obtidas dos clones de cada estratégia repetiu-se.

O programa Clustal W 2.1 foi utilizado para a análise das sequências de aminoácidos obtidas, em múltiplos alinhamentos, para a identificação de regiões conservadas ou motivos comuns entre os peptídeos selecionados. Não foram constatadas sequências consenso nos alinhamentos dos peptídeos. Algumas semelhanças bioquímicas entre os peptídeos foram evidenciadas pela representação de cores iguais nos aminoácidos identificados (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências de aminoácidos e alinhamento dos peptídeos obtidos após o processo de *biopanning* nas duas estratégias de seleção (1- IgY anti-iL3 e 2- IgY anti-Fp). Os alinhamentos dos peptídeos identificados foram realizados pelo programa Clustal W 2.1.

Estratégia/Clones	Sequência de aa	Alinhamento
Estratégia 1 - IgY anti-iL3		
C12	PWPSVAS	--PWPSVAS--
D4	LNANSGL	---LNANSGL
F4	MHALPKS	MHALPKS----
Estratégia 2 - IgY anti-Fp		
E4	DNHLEQV	--DNHLEQV-
E5	TEKTEVF	TEKTEVF---
F8	TDLLDMQ	---TDLLDMQ

Características bioquímicas dos aminoácidos: verde = polares; vermelho = hidrofóbicos; azul = ácidos; rosa = básicos.

Todos os clones sequenciados por meio das duas estratégias empregadas apresentaram similaridade com proteínas de *S. stercoralis* registradas no *GeneBank* e acessadas pelo BLAST (Tabela 4).

Tabela 4 - Similaridades entre as sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidos por *phage display* com proteínas de *S. stercoralis*, registradas no GenBank, acessados pelo BLASTp.

Clones	Proteínas alinhadas	Número de acesso	E-value	Query cover	Total Score	ID
Estratégia 1 - IgY anti-iL3						
C12	1- cytochrome <i>b</i> (mitochondrion)	YP_009186376.1	6,8	57 %	13,4	75 %
D4	1- <i>G protein alpha subunit 3</i>	AAK54043.1	1	57 %	15,5	100 %
	2- <i>cofactor-independent phosphoglycerate mutase</i>	ARR68985.1	4,4	71 %	13,8	80 %
	3- <i>forkhead transcription factor 1 isoform a</i>	AAQ23177.1	10	85 %	12,9	67 %
	4- <i>NADH dehydrogenase subunit 2</i>	YP_009186385.1	346	100 %	9,1	57 %
F4	1- <i>NADH dehydrogenase subunit 5</i>	CAD90562.1	3,8	85 %	10,4	67 %
Estratégia 2 - IgY anti-Fp						
E4	1- <i>insulin-like receptor protein tyrosine kinase isoform B</i>	AGC25444.1	0,34	57 %	16,8	100 %
	2- <i>insulin-like receptor protein tyrosine kinase isoform A</i>	AGC25443.1	0,34	57 %	16,8	100 %
	3- <i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit</i>	AFJ11261.1	16	71 %	12,5	80 %
	4- <i>TPA: eukaryotic translation elongation factor 1A</i>	DAA05874.1	23	71 %	12,1	80 %
E5	1- <i>cullin-like protein</i>	AAF22129.1	0,34	85 %	16,8	83 %
	2- <i>serine/threonine-protein kinase</i>	AII82336.1	6,8	71 %	13,4	80 %
F8	1- <i>SRPN-1</i>	AGC25445.1	1	57 %	15,5	100 %

ID – Identidade .

4.7 – Aplicação dos clones de fagos selecionados no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

Após a validação, sequenciamento e análise das sequências obtidas, os clones de fagos selecionados contendo peptídeos expressos considerados específicos ao *Strongyloides* sp. foram amplificados, quantificados e aplicados como ferramenta diagnóstica para a estrogiloidíase humana. Nos testes *phage*-ELISA, os clones de fagos selecionados desempenham o papel dos complexos antigênicos, em testes ELISA indiretos, utilizados para a detecção de anticorpos específicos ao parasita causador da enfermidade, circulantes no soro dos pacientes. O potencial no diagnóstico sorológico dos clones obtidos foi avaliado no mesmo perfil de grupos de pacientes utilizados no ensaio para a detecção de imunocomplexos.

Os valores de IE dos três grupos de soros de pacientes apresentaram diferença estatística para todos os clones de fagos testados de ambas as estratégias (Estratégia 1 – [C12] $H = 57,98$, $P < 0,001$; [D4] $H = 62,86$, $P < 0,001$; [F4] $H = 42,71$, $P < 0,001$. Estratégia 2 – [E4] $H = 36,84$, $P < 0,001$; [E5] $H = 39,96$, $P < 0,001$; [F8] $H = 45,49$, $P < 0,001$). Quando comparados os valores de IE entre cada grupo de pacientes pelo pós-teste de Dunn, na estratégia 1, diferença estatística foi encontrada entre o grupo positivo e os grupos negativo e com outras parasitoses ($P < 0,001$) nos testes usando todos os clones de fagos (Fig. 17, A1, B1 e C1). Diferença semelhante foi observada no clone E5 da estratégia 2 ($P < 0,001$) (Fig. 18, B1), enquanto os outros clones da mesma estratégia apresentaram diferença estatística entre todos os grupos de pacientes ($P < 0,05$) (Fig. 18, A1 e C1).

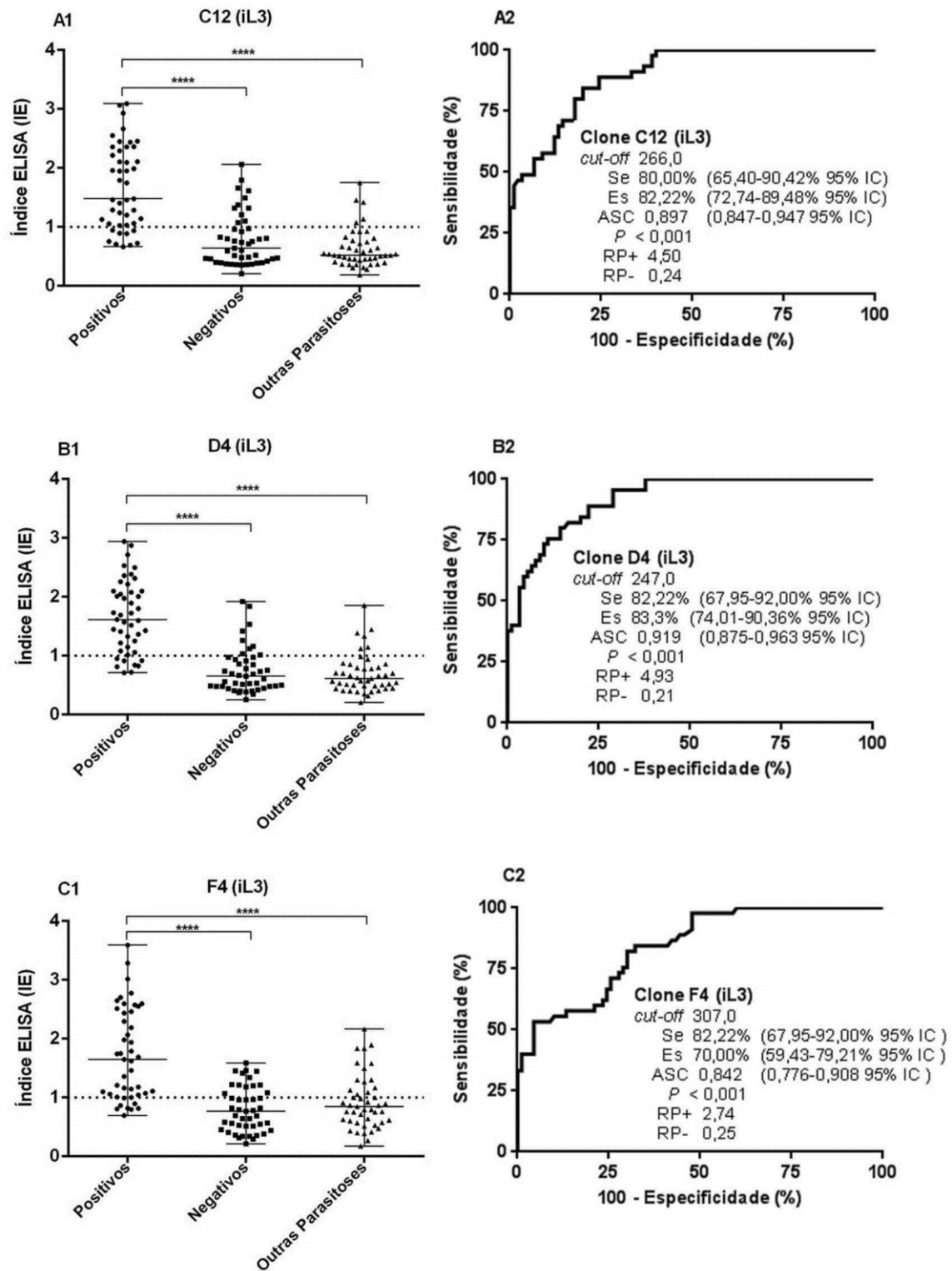


Figura 17 – Phage-ELISA para a detecção de anticorpos IgG utilizando clones de fagos expressando peptídeos obtidos na estratégia 1 (IgY anti-iL3) do *biopanning* (A. clone C12, B. clone D4, C. clone F4) em amostras de soro de pacientes com estrongiloidíase confirmada ($n = 45$), indivíduos negativos ($n = 45$) e com outras parasitoses ($n = 45$); 1. ****- Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,0001$), *- $P < 0,001$, * - $P < 0,05$; 2. Receiver operating characteristic curves (curva ROC) indicando, valores de cut-off, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC) e razões de probabilidades (RP+ e RP-), intervalo de confiança (IC 95 %).

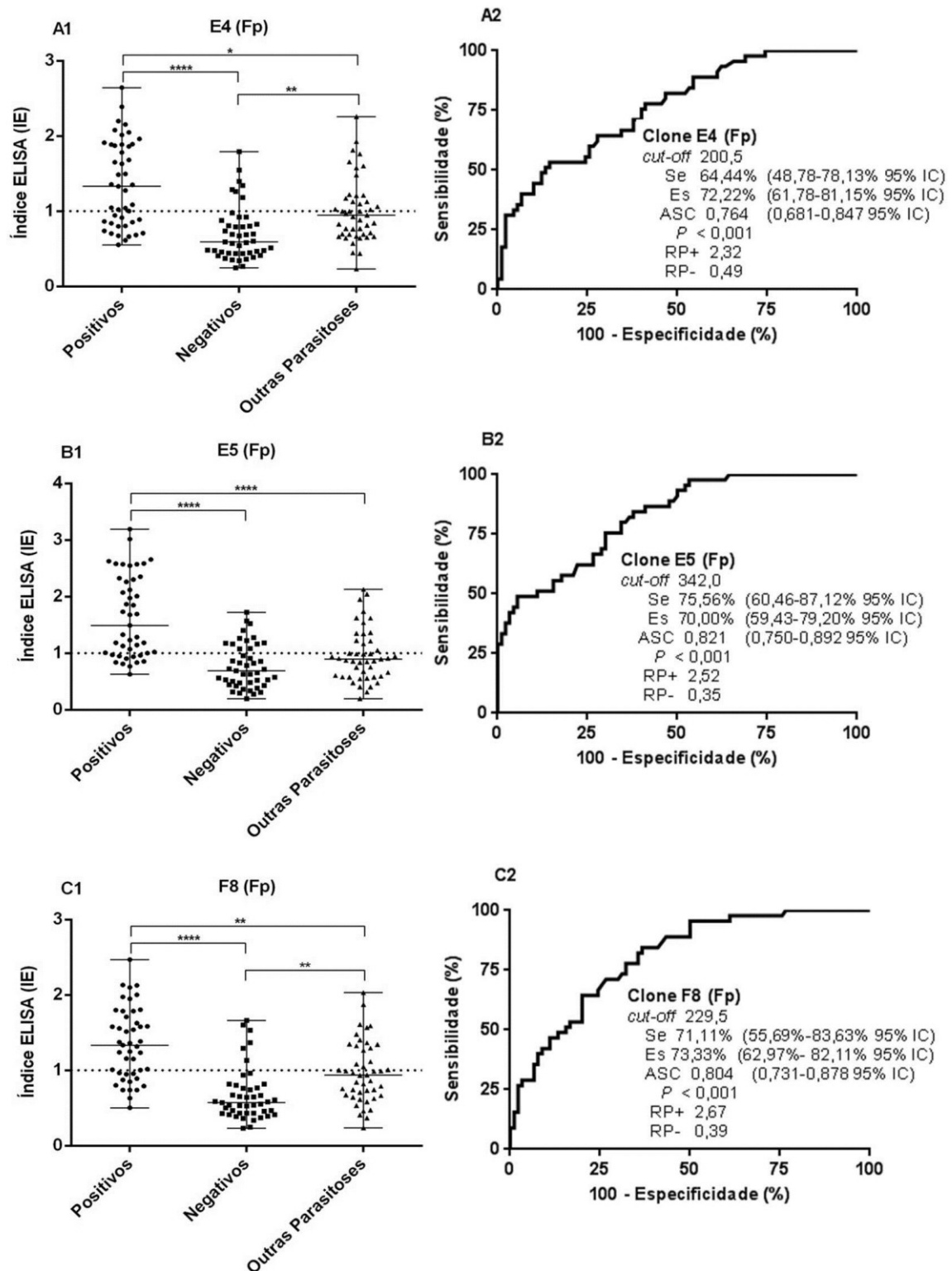


Figura 18 - Phage-ELISA para a detecção de anticorpos IgG utilizando clones de fagos expressando peptídeos obtidos na estratégia 2 (IgY anti-Fp) do *biopanning* (A. clone E4, B. clone E5, C. clone F8) em amostras de soro de pacientes com estrongiloidiase confirmada ($n = 45$), indivíduos saudáveis ($n = 45$) e com outras parasitoses ($n = 45$); 1. ****- Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,0001$), **- $P < 0,001$, *- $P < 0,05$; 2. Receiver operating characteristic curves (curva ROC) indicando, valores de cut-off, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC) e razões de probabilidades (RP+ e RP-)

O número de amostras positivas dos três grupos de pacientes utilizando os clones de fagos das duas estratégias de seleção está explicado na Tabela 5. Dos clones selecionados a Se variou de 64,44 % no teste com o clone E4 (Fp) até 82,22 % utilizando D4 e F4, ambos da estratégia com IgY anti-iL3. De forma geral os parâmetros diagnósticos encontrados com os clones derivados do protocolo com iL3 foram melhores que os obtidos da estratégia com Fp. Valores de RP+ entre 2 e 5 indicam um pequeno aumento na probabilidade da doença. Valores de RP- entre 0,2 e 0,5 indicam pequeno decréscimo na probabilidade da doença.

Tabela 5 - Reatividade das amostras de soros de pacientes com strongiloidíase confirmada, indivíduos saudáveis e com outras parasitoses em testes *phage*-ELISA, utilizando os clones de fagos selecionados nas estratégias 1 e 2 de *biopanning*, na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*. Amostras foram consideradas positivas quando o IE > 1,0.

Amostras de soros	Amostras reativas (IE > 1,0) - Estratégia/Clones					
	1 – C12	1 – D4	1 – F4	2 – E4	2 – E5	2 – F8
Positivos (n = 45)	36 (80%)	37 (82,2%)	37 (82,2%)	29 (64,4%)	33 (73,3%)	34 (75,6%)
Negativos (n = 45)	11 (24,4%)	9 (20%)	13 (28,9%)	7 (15,6%)	6 (13,3%)	13 (28,9%)
Outras Parasitoses (n = 45)						
Ancilostomatídeos (n = 7)	2	2	2	3	2	3
<i>Ascaris lumbricoides</i> (n = 6)	-	-	-	1	-	-
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> (n = 4)	-	1	2	2	2	1
<i>Enterobius vermicularis</i> (n = 6)	1	1	3	3	3	3
<i>Giardia lamblia</i> (n = 6)	-	-	1	2	1	1
<i>Hymenolepis nana</i> (n = 4)	-	-	1	2	1	2
<i>Schistosoma mansoni</i> (n = 6)	2	2	3	4	3	5
<i>Taenia</i> sp. (n = 6)	-	-	2	1	2	3
Total (Outras Parasitoses) (n = 45)	5 (11,1%)	6 (13,3%)	14 (31,1%)	18 (40%)	14 (31,1%)	18 (40%)

As comparações entre áreas sob curvas (ASC) resultantes das curvas ROC de todos os ensaios foram comparadas pelo método de DeLong *et al.* (1988) e estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparações entre áreas sob curvas (ASC) dos testes de diagnóstico sorológico utilizando os clones de fagos selecionados nas estratégias 1 e 2 de *biopanning*, na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* específicos por *phage*-ELISA.

<i>Phage</i> -ELISA (Clones)/Estratégia	Diferença entre ASC	SE	IC 95%	DeLong <i>et al.</i> , 1988	Significância estatística
C12 (1) vs D4 (1)	0,0220	0,0253	-0,0277-0,0716	$z = 0,868$	$P = 0,3856$
C12 (1) vs F4 (1)	0,0549	0,0367	-0,0169-0,127	$z = 1,498$	$P = 0,1341$
C12 (1) vs E4 (2)	0,133	0,0443	0,0462-0,220	$z = 3,004$	$P = 0,0027^*$
C12 (1) vs E5 (2)	0,0758	0,0412	-0,00486-0,156	$z = 1,842$	$P = 0,0655$
C12 (1) vs F8 (2)	0,0925	0,0400	0,0140-0,171	$z = 2,309$	$P = 0,0209^*$
D4 (1) vs F4 (1)	0,0769	0,0265	0,0251-0,129	$z = 2,908$	$P = 0,0036^*$
D4 (1) vs E4 (2)	0,155	0,0331	0,0901-0,220	$z = 4,682$	$P < 0,0001^*$
D4 (1) vs E5 (2)	0,0978	0,0312	0,0366-0,159	$z = 3,132$	$P = 0,0017^*$
D4 (1) vs F8 (2)	0,114	0,0297	0,0561-0,173	$z = 3,847$	$P = 0,0001^*$
F4 (1) vs E4 (2)	0,0780	0,0325	0,0144-0,142	$z = 2,402$	$P = 0,0163^*$
F4 (1) vs E5 (2)	0,0209	0,0177	-0,0138-0,0556	$z = 1,178$	$P = 0,2388$
F4 (1) vs F8 (2)	0,0375	0,0266	-0,0146-0,0897	$z = 1,410$	$P = 0,1584$
E4 (2) vs E5 (2)	0,0572	0,0367	-0,0147-0,129	$z = 1,559$	$P = 0,1189$
E4 (2) vs F8 (2)	0,0405	0,0338	-0,0257-0,107	$z = 1,200$	$P = 0,2302$
E5 (2) vs F8 (2)	0,0167	0,0231	-0,0286-0,0619	$z = 0,722$	$P = 0,4701$

Estratégia (1) – anticorpos IgY anti-iL3; Estratégia (2) – anticorpos IgY anti-Fp. SE – erro padrão; IC 95 % - intervalo de confiança de 95 %; * - diferença estatística ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A produção de anticorpos policlonais é uma ferramenta biotecnológica amplamente utilizada em ensaios terapêuticos, em métodos de diagnóstico, em testes clínicos e em estudos experimentais de várias doenças. Nesta perspectiva, os anticorpos IgG de mamíferos, como coelhos, camundongos, ratos, cabras e equinos, possuem sua aplicabilidade reconhecida e predominam dentre os policlonais (GRAHAM; AMBROSINO, 2015; SALEMI *et al.*, 2015; BERRY, 2017; DAI *et al.*, 2017). Entretanto a produção desse tipo de anticorpos apresenta algumas limitações, principalmente pela quantidade de animais necessária para a obtenção de massa de anticorpos suficiente para as aplicações, incômodo animal pelo manejo e sangria dos mesmos e pelos eventuais casos de reatividade cruzada com alvos não específicos (CARLANDER; STÅLBERG; LARSSON, 1999; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2012a). Considerando a similaridade funcional com as moléculas de IgG, a distância evolutiva entre aves e mamíferos, a redução do sofrimento dos animais, e a reprodutibilidade na obtenção, os anticorpos IgY policlonais vêm sendo cada vez mais estudados e produzidos como alternativa ou em substituição aos anticorpos IgG de mamíferos (SCHADE *et al.*, 2005; PAULY *et al.*, 2009; SPILLNER *et al.*, 2012).

A imunização de galinhas poedeiras com extratos antigênicos proteicos derivados de helmintos como *T. solium* (MANHANI *et al.*, 2011), *Toxocara canis* (Da SILVA RAPOSO *et al.*, 2016), *Trichinella spiralis* (LIU *et al.*, 2013), *Ascaridia galli* (DAŞ *et al.*, 2017), *S. japonicum* (CAI *et al.*, 2012), e ainda com proteínas recombinantes de *Opisthorchis viverrini* (TEIMOORI *et al.*, 2017) e *Clonorchis sinensis* (NIE *et al.*, 2014) foram previamente descritas com sucesso. Estes estudos demonstraram a produção de anticorpos IgY proveniente de gemas de ovos e do soro de galinhas, com elevada especificidade e aplicações no diagnóstico e em aspectos do estudo experimental das parasitoses. Evidenciaram ainda a capacidade de detecção de antígenos circulantes em amostras de soro e fezes de seres humanos e animais experimentais, além da possibilidade de seleção de peptídeos ligantes específicos aos anticorpos IgY pela técnica de *phage-display*. O presente estudo tratou pela primeira vez, da produção e da purificação de anticorpos IgY, provenientes de gemas de ovos de galinhas, imunizadas com extratos antigênicos de *S. venezuelensis*, *A. ceylanicum* e *A. suum* com o intuito principal do desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que possam ser aplicadas no estudo experimental e imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

O método de imunização realizado com adjuvantes de Freund e extratos antigênicos proteicos pela via intramuscular é amplamente utilizado (QU *et al.*, 2011; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2012). Esse processo pode provocar a queda na produção de ovos e o desenvolvimento de processos inflamatórios nos locais de aplicação. A opção por aplicações na musculatura peitoral dividindo o volume, em quatro pontos distintos, pode contribuir para a redução destes efeitos adversos (SCHWARZKOPF; THIELE, 1996; CHALGHOUMI *et al.*, 2008). O monitoramento dos animais e da postura de ovos neste estudo não revelaram estes efeitos adversos da imunização com adjuvantes de Freund.

Vários estudos apresentam pelo menos seis diferentes formas de protocolos de obtenção do precipitado de anticorpos IgY, com destaque para o método de diluição em água com ajuste de pH e para as precipitações pela adição de polietilenoglicol, sais como sulfato de sódio e de amônio, solventes orgânicos, polissacarídeos aniônicos e ácido caprílico. Contudo esses precipitados podem apresentar ainda outras proteínas solúveis em água, como as ovoalbuminas (MEULENAER; HUYGHEBAERT, 2001; REN *et al.*, 2016). Recentemente, outra forma de purificação de anticorpos IgY foi descrita, utilizando a proteína M transmembrana de micoplasma humano, que apresenta afinidade pela porção Fc das moléculas de IgY, diferentemente das proteínas ligantes de imunoglobulinas A e G (JIANG; DIRAVIYAM; ZHANG, 2016).

A cromatografia líquida para as moléculas de IgY utilizada na última etapa de obtenção dos anticorpos resulta em amostras com elevado grau de pureza (HANSEN *et al.*, 1998). Este fato, no presente estudo, foi comprovado pela não visualização de bandas polipeptídicas diferentes das cadeias leves e pesadas características das moléculas de IgY, obtidas do processo de purificação e resolvidas pela eletroforese em gel de poliacrilamida. O protocolo de purificação dos anticorpos empregado demonstrou grande rendimento de massa de anticorpos IgY (3,5-4,5 mg/mL de gema), até 75 % do total de proteínas precipitadas pelo sulfato de amônio. Esses valores correspondem às estimativas de anticorpos IgY purificados de gemas, transferidos passivamente por meio de receptores na membrana do folículo ovariano de galinhas imunizadas (2-8 mg/mL) (SCHADE *et al.*, 2005). Ferreira Júnior *et al.*, (2012) obtiveram concentração de 4 mg/mL de anticorpos IgY purificados, de maneira semelhante a este estudo, com exceção da etapa cromatográfica com coluna específica para IgY.

A presença de anticorpos IgY específicos obtidos das gemas foi encontrada a partir da segunda semana em dois grupos de animais (IgY anti-Fp e anti-AAAs), logo após a primeira dose de imunização. Em todos os grupos, com o decorrer das aplicações, os títulos de

anticorpos específicos foram aumentando, atingindo o ápice entre a sexta e oitava semana do experimento, após a terceira ou quarta dose de antígeno e adjuvante aplicada. A ocorrência de um pico de produção de anticorpos específicos, após a terceira dose de imunização, pode ser um indicativo do momento ideal para a obtenção dos anticorpos, para a redução do estresse dos animais com as injeções, as coletas de sangue e o manejo e ainda para o direcionamento dos esforços laboratoriais e possíveis economias de materiais. Tais sugestões coincidem com o encontrado em protocolos de imunização semelhantes e também em métodos de purificação diferentes, como as precipitações com sulfato de sódio e polietilenoglicol 6000 (GARCIA *et al.*, 2005; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2014).

O alto grau de interação entre os anticorpos IgY produzidos e os respectivos alvos antigênicos foi confirmado pelos elevados índices avides (IA) encontrados, considerando resultados de $IA < 40\%$ como baixa avides e $IA > 60\%$ como alta avides (VILIBIC-CAVLEK *et al.*, 2016). Assim como no ELISA de cinética de produção de anticorpos específicos, os maiores valores de IA ocorreram principalmente entre a sexta e oitava semanas dos experimentos, reforçando a possibilidade de utilização das semanas com maior quantidade de anticorpos específicos. A especificidade dos anticorpos IgY obtidos foi confirmada pelo reconhecimento dos alvos antigênicos imobilizados em diferentes reações imunológicas. A aplicação de anticorpos IgY em ensaios *Immunoblotting* e reações de imunofluorescência é bem conhecida (FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2012; GRANDO *et al.*, 2017) e representa uma possibilidade de aplicação no âmbito do imunodiagnóstico da estrogiloidíase (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014).

O diagnóstico rápido e efetivo para a estrogiloidíase humana é de extrema importância, a fim de se evitar o desenvolvimento de casos crônicos, hiperinfecções ou disseminações. Aliados à necessidade de maiores investimentos financeiros e da realização de estudos sobre prevalência, tratamento e fatores de risco, essas complicações são consideradas determinantes para a persistência global da espécie e dos óbitos causados pela parasitose (MARCOS *et al.*, 2011; BISOFFI *et al.*, 2013; SCHÄR *et al.*, 2013). Diante da inexistência de um teste considerado “padrão ouro”, vários estudos sobre o imunodiagnóstico da estrogiloidíase vêm sendo realizados. Os testes parasitológicos são os mais comumente utilizados, mas são característicos por apresentarem baixa sensibilidade, principalmente pela ausência de eliminação de ovos e intermitência e/ou baixa liberação das larvas nas fezes, principalmente nos pacientes crônicos. Dessa forma, os testes imunológicos podem contribuir significativamente com as limitações encontradas nas análises parasitológicas (DREYER *et al.*, 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Como

ferramentas diagnósticas foram utilizados principalmente preparados antigênicos totais, fracionados, excreção/secreção e recombinantes para a detecção de anticorpos específicos circulantes (IgG, IgA e IgE) em amostras de soro ou saliva de pacientes (SUDRÉ *et al.*, 2006; GONZAGA *et al.*, 2013; FELICIANO *et al.*, 2014; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; BOSQUI *et al.*, 2015; FELICIANO *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2017).

A detecção de imunocomplexos em amostras de soro é outra possibilidade metodológica para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. Previamente, coelhos foram utilizados para a produção e purificação de anticorpos IgG específicos a extratos antigênicos de ovos, larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* (GONÇALVES *et al.*, 2012a). Coelhos também foram imunizados para a produção de anticorpos específicos a larvas e adultos de *S. ratti*, que foram purificados e aplicados na detecção de coproantígenos em ratos experimentalmente infectados (NAGESWARAN; CRAIG; DEVANEY, 1994). A geração de um *single-chain variable fragment* (scFv) específico à proteína HSP60 de larva filarioide de *S. venezuelensis* também evidenciou a detecção de imunocomplexos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (LEVENHAGEN *et al.*, 2015). Estudos para a identificação de imunocomplexos também foram realizados em outras infecções como toxoplasmose (CHAVES-BORGES *et al.*, 1999), leishmaniose (de CARVALHO *et al.*, 2013) e dengue (EMMERICH; MIKA; SCHMITZ, 2013). Neste contexto, uma das vertentes do trabalho foi a de aplicar pela primeira vez, anticorpos IgY policlonais na detecção de imunocomplexos em amostras de soros de pacientes infectados com *S. stercoralis*.

Os anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp foram avaliados como duas ferramentas distintas para o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase, no mesmo painel de indivíduos e apresentaram *performances* similares na detecção de imunocomplexos. Ambos os anticorpos reconheceram dois indivíduos falso positivos no grupo de indivíduos considerados saudáveis. Amostras de soro de cinco pacientes (5/45; 11,11 %) com outras parasitoses apresentaram reatividade cruzada nos dois testes empregados: ancilostomatídeos (2/45; 4,44 %), *S. mansoni* (1/45; 2,22 %), *Taenia* sp. (1/45; 2,22 %) e *E. histolytica/dispar* (1/45; 2,22 %). Os anticorpos IgY anti-iL3 reconheceram duas amostras de soro a mais como reativas no mesmo grupo totalizando sete amostras (7/45; 15,56 %), sendo elas de um paciente com ancilostomatídeos e outro com *A. lumbricoides*. Resultados contrastantes foram observados por Gonçalves *et al.* (2012a) na identificação de imunocomplexos em pacientes considerados falso positivos em um perfil de 30 amostras de soro. Utilizando-se anticorpos IgG anti-iL3 produzidos em coelhos, foi demonstrada reatividade cruzada em 6/30 (20 %) indivíduos com *A. lumbricoides* (1/30; 3,33 %), *E. vermicularis* (2/30; 6,67 %), ancilostomatídeos (1/30; 3,33 %)

e *S. mansoni* (2/30; 6,67 %). Os anticorpos IgG de coelhos anti-Fp resultaram em 11/30 (36,67 %) casos falsos positivos em pacientes com *E. vermicularis* (2/30; 6,67 %), *A. lumbricoides* (4/30; 13,33 %), *G. lamblia* (2/30; 6,67 %) e *S. mansoni* (3/30; 10 %). Esses resultados sugerem uma menor ocorrência de reatividade cruzada no diagnóstico sorológico da strongiloidíase utilizando anticorpos IgY obtidos de gemas de galinhas poedeiras quando comparados aos anticorpos IgG produzidos em coelhos. A respeito dos valores de diagnóstico de sensibilidade e especificidade, os anticorpos IgY e IgG de coelhos contra extrato de larva filarioide de *S. venezuelensis* apresentaram pequenas diferenças respectivamente (Se: 95,56 %; Es: 88,89 % vs Se: 93,3 %; Es: 86,1 %). Quando comparadas, IgY e IgG, contra antígenos de fêmeas partenogenéticas da mesma espécie, os anticorpos IgY demonstraram maiores valores diagnósticos (Se: 95,56 %; Es: 91,11 %) que os anticorpos IgG de coelhos (Se: 66,6 %; Es: 72,3 %). Vários estudos consideraram as preparações antigênicas derivadas de larvas filarioides de *Strongyloides* sp. mais relevantes para o diagnóstico sorológico da strongiloidíase (VAN DOORN *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2012b; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Neste estudo o extrato antigênico de fêmeas partenogenéticas proporcionou a produção de anticorpos IgY com melhores valores diagnósticos. Esses resultados demonstraram a importância da realização de mais estudos com proteínas derivadas de fêmeas partenogenéticas, considerando a persistência dessa fase de vida do parasito na infecção, estabelecida na mucosa intestinal dos hospedeiros.

No contexto do imunodiagnóstico da strongiloidíase, a outra vertente do presente estudo foi utilizar a tecnologia de *phage-display* empregando os anticorpos IgY previamente produzidos, para a seleção de peptídeos fusionados a bacteriófagos que pudessem ser aplicados na detecção de anticorpos IgG, circulantes em amostras de soro de pacientes acometidos da strongiloidíase, por meio de testes *phage*-ELISA. Dentre as diversas aplicações da técnica, ressaltam-se possibilidades em relação ao diagnóstico e terapia de doenças (RAHBARNIA *et al.*, 2017). Esta abordagem de seleção de clones de fagos fusionados a peptídeos, com finalidade diagnóstica, foi previamente realizada com outros tipos de anticorpos e com diferentes alvos, como nos casos envolvendo anticorpos IgG purificados de soro de pacientes com strongiloidíase (FELICIANO *et al.*, 2014), anticorpos IgY provenientes de soro de galinhas imunizadas com extratos antigênicos de *T. solium* (MANHANI *et al.*, 2011), anticorpos IgG de soros de pacientes com neurocisticercose (RIBEIRO *et al.*, 2010), e anticorpos IgG de cães (COSTA *et al.*, 2014) e de seres humanos (COSTA *et al.*, 2016; SALLES *et al.*, 2017) diagnosticados com *Leishmania infantum*. A seleção de fagos com peptídeos específicos, que podem ser amplificados em grandes

quantidades para aplicação na rotina laboratorial, também pode ser uma alternativa aos preparados antigênicos totais que requerem a manutenção e o manejo de animais experimentalmente infectados ou coletas de amostras fecais de indivíduos infectados (RAMACHANDRAN *et al.*, 1998).

As duas estratégias de seleção de fagos ligantes às moléculas de IgY produzidas foram realizadas com a biblioteca de peptídeos de sete aminoácidos conformacionais (Ph.D.-C7C) expressos em fagos filamentosos M13. A seleção negativa de clones foi realizada com anticorpos IgY específicos a *A. ceylanicum* e *A. suum*. O intuito desta seleção foi de minimizar possíveis casos de reatividade cruzada em amostras de soros de pacientes portadores de ascaridíase e ancilostomíase, parasitoses estas provocadas por espécies de helmintos com proximidade filogenética e epidemiologias semelhantes ao *S. stercoralis*, como previamente detectados em outros trabalhos envolvendo o diagnóstico sorológico da strongiloidíase (FELICIANO *et al.*, 2014; LEVENHAGEN *et al.*, 2015; FELICIANO *et al.*, 2016).

Foram identificados seis clones de fagos com diferentes sequências de aminoácidos, após as pré-validações e sequenciamento, sendo três de cada estratégia de *biopanning* aplicada. Todas as sequências de peptídeos apresentaram diferentes graus de similaridade com proteínas de *S. stercoralis* indicados pela ferramenta BLASTp. Todos os alinhamentos encontrados apresentaram baixos valores de *Score* (< 40). Os elevados valores de *E-value* encontrados são característicos de sequências curtas, com poucos resíduos, no caso apenas sete aminoácidos. Considerando as sequências dos clones que apresentaram valores de *E-value* mais próximos de 0, indicando menor probabilidade dos alinhamentos ocorrerem ao acaso, maiores valores de *Score* e de identidade, destacam-se o clone D4 da estratégia 1 e os clones E4 e E5 da estratégia 2. Em relação ao clone D4, o principal alinhamento ocorreu com a proteína gpa-3 (*G protein alpha subunit 3*), que atua como mediador para a regulação das fases de vida livre e parasitária, a retenção do desenvolvimento na larva filarioide antes da penetração no hospedeiro e a sua reativação depois da infecção (MASSEY Jr.; BALL; LOK, 2001). Avaliando o clone E4, a principal similaridade foi encontrada com as proteínas *insulin-like receptor protein tyrosine kinase* isoformas A e B, que desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento, metabolismo energético e regulação do tempo de vida (MASSEY Jr. *et al.*, 2013). O clone E5 apresentou similaridade com a proteína *cullin-like protein* que é envolvida na modificação pós-traducional de proteínas celulares envolvendo a ubiquitina (SARIKAS; HARTMANN; PAN, 2011).

A ocorrência de reatividade cruzada no diagnóstico sorológico de helmintíases ocorre com frequência, e está associada principalmente pela proximidade filogenética, similaridade antigênica entre os parasitos e pela coexistência de áreas endêmicas para várias espécies parasitárias. A reatividade dentre os indivíduos considerados saudáveis pode ser motivada por uma exposição ao parasito anterior aos exames parasitológicos, resguardando uma possível memória imunológica detectada nos testes. Dessa forma, a busca por ferramentas biotecnológicas que tornem o diagnóstico mais sensível e específico é de suma importância. Em se tratando da *estrongiloidíase*, são essenciais para o conhecimento da real situação epidemiológica e condução correta dos tratamentos, diminuindo as taxas de mortalidade e morbidade da doença (GROVE, 1996; BISOFFI *et al.*, 2013).

Quando comparados os resultados dos dois métodos diagnósticos empregados no presente estudo, sendo o primeiro envolvendo os anticorpos IgY fracionados na detecção de imunocomplexos, e o segundo com os clones de fagos expressando peptídeos na identificação de anticorpos IgG, no mesmo perfil de amostras de soro, os melhores valores foram evidenciados quando utilizados os anticorpos IgY na primeira condição. A ocorrência do maior número de casos falsos positivos utilizando os testes *phage*-ELISA, pode ser motivada pelo desenvolvimento de resposta imune humoral contra bacteriófagos que ocorrem de forma natural na microbiota intestinal e no trato digestivo dos seres humanos (MIRZAEI; MAURICE, 2017; NAVARRO; MUNIESA, 2017). Esses resultados não inviabilizam a realização da seleção de clones com peptídeos ligantes dos anticorpos IgY pela técnica de *phage-display*, mas sugerem a importância da aplicação de novas técnicas no sentido de minimizar a ocorrência de reatividade cruzada e aumentar a especificidade dos testes. Após a seleção e identificação dos clones viáveis, uma alternativa seria a síntese química dos peptídeos identificados livres das partículas virais para a aplicação no imunodiagnóstico (NOYA *et al.*, 2003; FELICIANO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017).

Após a pré-validação dos clones de fagos selecionados, os mesmos foram submetidos ao sequenciamento de DNA e dedução das sequências de aminoácidos correspondentes de cada peptídeo expresso em cada clone. Os clones mais reativos, considerados mais específicos da estratégia 1 (G2, G3 e H1) e da estratégia 2 (E3 e G7), no ensaio *phage*-ELISA com *pool* de soros dos pacientes, não apresentaram sequências válidas. O tal fato impediu a continuação dos testes para aplicação diagnóstica desses clones. Os ensaios de aplicação diagnóstica (*phage*-ELISA) foram realizados apenas com os clones que apresentaram sequências de aminoácidos válidas em cada estratégia (1 – C12, D4 e F4; 2 – E4, E5 e F8). Comparando os valores de área sob a curva (ASC), obtidos pela curva ROC, entre os clones das mesmas

estratégias não foram encontradas diferenças estatísticas. Mas o contrário aconteceu quando comparados os valores entre os clones de estratégias diferentes, confirmando os melhores resultados diagnósticos da seleção de clones ligantes dos anticorpos IgY anti-iL3. Considerando os clones D4 e C12 da estratégia 1, como os melhores resultados de diagnóstico encontrados (D4 – Se: 82,2 %, Es: 83,3 %, ASC: 0,919 ; C12 – Se: 80,0 %, Es: 82,2 %, ASC: 0,897) e comparados com os resultados de Feliciano *et al.* (2014), que selecionaram fagos com peptídeos ligantes de IgG provenientes de amostras de soro de pacientes com *strongiloidíase* (C9 – Se: 87,5 %, Es: 80,0 %, ASC: 0,871; C10 – Se: 85,0 %, Es: 77,5 %, ASC: 0,889; D3 – Se: 80,0 %, Es: 75,0 %, ASC: 0,871) valores diagnósticos semelhantes foram encontrados. Os melhores clones obtidos neste estudo apresentaram ainda casos de reatividade cruzada similares ou inferiores (D4 – 6/45 [13,3 %]; C12 – 5/45 [11,1 %] aos melhores clones ligantes de IgG, que usou um painel de soros menor, com 40 amostras (C9 – 5/40 [12,5 %]; C10 – 7/40 [17,5 %]; D3 – 8/40 [20 %]). Os resultados demonstraram que a técnica de *phage-display*, utilizando anticorpos IgY proveniente de gemas, assim como usando anticorpos IgG de soro de pacientes, foi capaz de selecionar fagos com peptídeos de estrutura similar aos antígenos parasitários de *Strongyloides* sp. e com aplicações diagnósticas para a *strongiloidíase* humana.

Comprovada a especificidade e o alto grau de rendimento, os anticorpos IgY produzidos podem ser aplicados em novas perspectivas de padronizações em outras plataformas experimentais. Destacam-se os ensaios de imunohistoquímica para marcação de antígenos parasitários em cortes de tecidos humanos e animais infectados, detecção de coproantígenos e ensaios de imunoprecipitação, para posterior identificação dos principais epítomos ligantes por espectrometria de massas. Após a identificação das principais proteínas ligantes dos anticorpos, elas poderão ser produzidas de forma recombinante e utilizadas como ferramentas diagnósticas e como alvos vacinais. Também podem ser utilizados como anticorpos secundários acoplados às enzimas, como a peroxidase, para os ensaios imunoenzimáticos de rotinas laboratoriais e para testes de neutralização/imobilização das formas de vida do parasita *in vitro* e *in vivo*. Os clones selecionados, após o *biopanning*, ainda podem ser utilizados para a síntese química dos peptídeos expressos, ausentes das partículas virais, na tentativa de aumentar a sensibilidade e especificidade no imunodiagnóstico. Como os mesmos podem ser obtidos rotineiramente e em larga escala em culturas bacterianas, são viáveis como plataforma diagnóstica.

As galinhas poedeiras imunizadas com extratos antigênicos de *S. venezuelensis* são capazes de produzir anticorpos IgY com elevado grau de rendimento e especificidade. Essa

ferramenta biotecnológica provou mais uma vez sua consistência metodológica e reprodutibilidade, além da aplicabilidade em vários modelos experimentais. O foco do estudo foi concentrado na utilização dos anticorpos em dois principais métodos para o diagnóstico sorológico da *estrongiloidíase* humana, sendo a detecção de imunocomplexos e de anticorpos IgG específicos em amostras e soro de pacientes, ambos capazes de serem incorporados às rotinas laboratoriais das áreas endêmicas. Acredita-se que os anticorpos IgY policlonais podem ser considerados como mais uma importante ferramenta promissora no estudo da *estrongiloidíase* experimental, em estudos epidemiológicos e em novas ferramentas de diagnóstico sorológico da doença.

6. CONCLUSÃO

- Galinhas poedeiras imunizadas com extratos antigênicos de *S. venezuelensis*, *A. ceylanicum* e *A. suum* foram capazes de produzir anticorpos IgY com alto grau de rendimento, especificidade e avides;
- As galinhas imunizadas com extratos antigênicos associados ao adjuvante de Freund foram capazes de produzir anticorpos IgY específicos precocemente, a partir da primeira dose de imunização, e com pico de produção de anticorpos específicos após as terceiras e quartas doses;
- A purificação de anticorpos IgY pelo método de diluição em água, precipitação de proteínas com sulfato de amônio e fracionamento em sistema de cromatografia completo com coluna específica de afinidade tiofílica proporcionam a obtenção de amostras com elevado grau de pureza e rendimento;
- Os anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp foram capazes de reconhecer antígenos parasitários imobilizados em testes *Immunoblotting* e em cortes histológicos em ensaios de imunofluorescência indireta;
- Os anticorpos IgY anti-iL3 e anti-Fp foram eficazes como ferramenta no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana pela detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soros de pacientes, diferenciando-os dos grupos de indivíduos saudáveis e com outras parasitoses;
- A técnica de *phage-display* pode selecionar clones de fagos com peptídeos expressos ligantes de moléculas de IgY produzidas contra antígenos de *S. venezuelensis*, que apresentaram similaridades estruturais com proteínas do parasita humano *S. stercoralis*;
- Clones de fagos com peptídeos expressos ligantes de moléculas IgY específicas a antígenos de larvas filarioides e fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* possuem aplicabilidade diagnóstica pela detecção de anticorpos IgG em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2010, 566 p.
- 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. 160, p. 207-214, 1993. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B)
- ALESSANDRO, R.; GALLO, A.; BARRANCA, M.; PRINCIPE, S.; TAVERNA, S.; DURO, G.; CASSATA, G.; BECCHI, M.; FONTANA, S.; De LEO, G. Production of an egg yolk antibody against *Parietaria judaica* 2 allergen. **Poultry Science**, v. 88, p. 1773-1778, 2009. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00054>
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 375-388, 2011. doi.org/10.1038/nri2992
- AMARAL, J. A.; TINO DE FRANCO, M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.; CARBONARE, S.B. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 229-234, 2002. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2002.0551>
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford: C.A.B. International, 2000, 650 p. <https://doi.org/10.1079/9780851994215.0000>
- ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOTTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; SHEN, K.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. Systemic cytokine profiles in *Strongyloides stercoralis* infection and alterations following treatment. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 425-431, 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.01354-15>
- ARAÚJO, A. S.; LOBATO, Z. I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; VELARDE, D. T.; Brazilian IgY-*Bothrops* antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon**, v. 55, p. 739-744, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.004>
- ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D.A. P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 517-526, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00248.x>
- AZIRA, N. M.; ABDEL RAHMAN, M. Z.; ZEEHAIDA, M. Review of patients with *Strongyloides stercoralis* infestation in a tertiary teaching hospital, Kelantan. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 35, p. 71-76, 2013.
- AZZAZI, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomum* (Nematoden) – Larven in Erdproben. Mededeel mit. H. Geneesk Batavia: **Laboratories Weltevreden, Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. **Phage display: a laboratory manual**. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 736 p.

BARÇANTE, J. M. P.; BARÇANTE, T. A.; DIAS, S. R.; VIEIRA, L. Q.; LIMA, W. S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitology Research**, v. 89, p. 89-93, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0719-z>

BEKNAZAROVA, M.; WHILEY, H.; ROSS, K. Strongyloidiasis: A disease of socioeconomic disadvantage. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 1-15, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijerph13050517>

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 1-33, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00054-9)

BENTES, G. A., LANZARINI, N. M., LIMA, L. R., MANSO, P. P. A., DA SILVA A. S., MOUTA JUNIOR S. S., GUIMARÃES, J. R., DE MORAES, M. T. B., PELAJO-MACHADO, M., PINTO, M. A. Using immunoglobulin y as an alternative antibody for the detection of hepatitis A virus in frozen liver sections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 577-579, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140457>

BERRY, C. M. Antibody immunoprophylaxis and immunotherapy for influenza virus infection: utilization of monoclonal or polyclonal antibodies? **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, (*In press*), 2017. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1363135>

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; MUÑOZ, J.; KROLEWIECKI, A. J.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; CHIODINI, P. L.; ANSELMINI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2214, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; SEQUI, M.; MEJIA, R.; CIMINO, R. O.; KROLEWIECKI, A. J.; ALBONICO, M.; GOBBO, M.; BONAFINI, S.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; MUÑOZ, J.; NUTMAN, T. B. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e2640, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002640>

BOCK, C. N.; BABU, S.; BRELOER, M.; RAJAMANICKAM, A.; BOOTHRA, Y.; BRUNN, M. L.; KÜHL, A. A.; MERLE, R.; LÖHNING, M.; HARTMANN, S.; RAUSCH, S. Th2/1 Hybrid cells occurring in murine and human strongyloidiasis share effector functions of Th1 cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-15, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00261>

BOSQUI, L. R.; GONÇALVES, A. L.; GONÇALVES-PIRES, M. DO R.; CUSTODIO, L. A.; DE MENEZES, M. C.; MURAD, V. A.; DE PAULA, F. M.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. **Acta Tropica**, v. 150, p. 190-195, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.026>

BOSQUI, L. R.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. D. R. F.; DE PAULA, F. M.; ALMEIDA, R. S.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M.; DA COSTA, I. N. Avidity as a criterion for diagnosis of human strongyloidiasis increases specificity of IgG ELISA. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, (*In press*), 2017. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.008>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**: guia de bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 448, 2010.

BRELOER, M.; ABRAHAM, D. *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. **Parasitology**, v. 144, p. 295–315, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000111>

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em FAGOS. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 26, p. 44-51, 2002.

BUONFRATE, D.; ANGHEBEN, A.; GOBBI, F.; MUÑOZ, J.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; BISOFFI, Z. Imported strongyloidiasis: epidemiology, presentations, and treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, p. 256–262, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11908-012-0248-6>

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. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 78-88, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-78>

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. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.01.008>

CARLANDER, D.; STÅLBERG, J.; LARSSON, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 104, p. 179-189, 1999. <https://doi.org/10.3109/03009739909178961>

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. <https://doi.org/10.1385/IR:21:1:1>

CHALGHOUMI, R.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Science**, v.87, p. 32-40, 2008. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00252>

CHAVES-BORGES, F. A.; SOUZA, M. A.; SILVA, D. A.; KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1 (p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 329-338, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651999000600001>

CIMINO, R. O.; KROLEWIECKI, A. The epidemiology of human strongyloidiasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p 216-222, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0035-6>

COELHO, E. A. F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, L. E.; TAVARES, C. A. P.; SOTO, M.; GOULART, L. R. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 370-379, 2015. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0096-2015>

CONSTANTINOIU, C. C.; MOLLOY, J. B.; JORGENSEN, W. K.; COLEMAN, G. T. Antibody response against endogenous stages of an attenuated strain of *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 193-204, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.029>

CORRAL, M. A.; PAULA, F. M.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D. M.; CHIEFFI, P. P.; GRYSCHKE, R. C. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 77-80, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100011>

CORTI, M.; VILLAFANE, M. F.; TRIONE, N.; RISSO, D.; ABUÍN, J. C.; PALMIERI, O. Infección por *Strongyloides stercoralis*: estudio epidemiológico, clínico, diagnóstico y terapéutico en 30 pacientes. **Revista Chilena de Infectología**, v. 28, p. 217-222, 2011. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000300003>

COSTA, I. N.; SOPELETE, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v. 48, p. 306-311, 2003.

COSTA, L. E.; LIMA, M. I.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MENEZES-SOUZA, D.; MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; LOPES, E. G.; LAGE, D. P.; RIBEIRO, T. G.; ANDRADE, P. H.; DE MAGALHÃES-SOARES, D. F.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, p. 96-106, 2014. <https://doi.org/10.1128/CVI.00583-13>

COSTA, L. E.; SALLES, B. C.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C.; VAZ, E. R.; RAMOS, F. F.; MENEZES-SOUZA, D.; DUARTE, M. C.; ROATT, B. M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; TAVARES, C. A.; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, M. O.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 39-45, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.04.005>

COSTA, L. E.; SALLES, B. C.; SANTOS, T. T. O.; RAMOS, F. F.; LIMA, M. P.; LIMA, M. I. S.; PORTELA, A. S. B.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SILVEIRA, J. A. G.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 14-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.020>

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

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; PIRES, M. R. F. G.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryomicrotome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 313-317, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000600001>

CUNHA, R. A.; DE CARVALHO, E. F. G.; DE SOUSA, J. E. N.; COSTA-CRUZ, J. M. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. **Parasitology International**, v. 66, p. 671-676, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.07.001>

Da SILVA RAPOSO, R.; SANTARÉM, V. A.; MERIGUETI, Y. F.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; De LIMA CERAZO, L. M.; PEREIRA, L.; ZAMPIERI, B. P.; Da SILVA, A. V.; LAPOSY, C. B. Kinetic and avidity of IgY anti-*Toxocara* antibodies in experimentally infected chickens. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 33-41, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.009>

DAI, Z.; LIU, Z.; XIU, B.; YANG, X.; ZHAO, P.; ZHANG, X.; DUAN, C.; QUE, H.; ZHANG, H.; FENG, X. A multiple-antigen detection assay for tuberculosis diagnosis based on broadly reactive polyclonal antibodies. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, p. 360-267, 2017.

DAŞ, G.; HENNIES, M.; SOHNREY, B.; RAHIMIAN, S.; WONGRAK, K.; STEHR, M.; GAULY, M. A comprehensive evaluation of an ELISA for the diagnosis of the two most common ascarids in chickens using plasma or egg yolks. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2121-9>

DAVISON, F.; MAGOR, K. E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, Elsevier: San Diego, 2008, 481 p. <https://doi.org/10.1016/B978-012370634-8.50009-3>

DE BONA, S.; BASSO, R. M. C. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* associada ao uso crônico de corticosteróide. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, p. 247-250, 2008.

De CARVALHO, C. A.; PARTATA, A. K.; HIRAMOTO, R. M.; BORBOREMA, S. E.; MEIRELES, L. R.; NASCIMENTO, N. D.; De ANDRADE, H. F. Jr. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. **Acta Tropica**, v. 125, p. 128-136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.010>

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE D. (Editor). **The Biology of Nematodes**. London: Taylor & Francis, p. 1-30, 2002. <https://doi.org/10.1201/b12614-2>

DeLONG, E. R., DeLONG, D. M., CLARKE-PEARSON, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics**, v. 44, p. 837-845, 1988. <https://doi.org/10.2307/2531595>

DEVI, U.; BORKAKOTY, B.; MAHANTA, J. Strongyloidiasis in Assam, India: a community-based study. **Tropical Parasitology**, v. 1, p. 30-32, 2011. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.72110>

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, p. 173-180, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011>

DIAZ, S. L.; PADLER-KARAVANI, V.; GHADERI, D.; HURTADO-ZIOLA, N.; YU, H.; CHEN, X.; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C.; VARKI, A.; VARKI, N. M. Sensitive and specific detection of the non-human sialic Acid N-glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. **PLoS One**, v. 4, p. e4241, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004241>

DING, J.; QIAN, W.; LIU, Q.; LIU, Q. Multi-epitope recombinant vaccine induces immunoprotection against mixed infection of *Eimeria* spp. **Parasitology Research**, v. 110, p. 2297-2306, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2764-y>

DREYER, G.; E.; FERNANDES-SILVA, E.; ALVES, S.; ROCHA, A.; ALBUQUERQUE, R.; ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2569-2571, 1996.

DUAN, H. L.; HE, Q. Y.; ZHOU, B.; WANG, W. W.; LI, B.; ZHANG, Y. Z.; DENG, Q. P.; ZHANG, Y. F.; YU, X. D. Anti-*Trimeresurus albolabris* venom IgY antibodies: Preparation, purification and neutralization efficacy. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, p. 1-6, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0078-3>

EDWARDS, B. M.; BARASH, S. C.; MAIN, S. H.; CHOI, G. H.; MINTER, R.; ULLRICH, S.; WILLIAMS, E.; DU FOU, L.; WILTON, J.; ALBERT, V. R.; RUBEN, S. M.; VAUGHAN, T. J. The remarkable flexibility of the human antibody repertoire; isolation of over one thousand different antibodies to a single protein, BLYS. **Journal of Molecular Biology**, v. 334, p. 103-118, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.054>

EL-BADRY, A. A. 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.

EMMERICH, P.; MIKA, A.; SCHMITZ, H. Detection of serotype-specific antibodies to the four dengue viruses using an immune complex binding (ICB) ELISA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2580, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002580>

ERHARD, M.; SCHADE, R. Short introduction to hen's humoral immune system. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk: antibodies, production and application – IgY-Technology**. Springer-Verlag, Berlin, p. 255, 2001. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_1

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.016>

FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; GONZAGA, H. T.; SANTOS, F. A.; FUJIMURA, P. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology Letters**, v. 172, p. 89-93, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.03.002>

FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; SANTOS, F. 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.

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. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.01.012>

FERREIRA JÚNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACÊDO JUNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, p. e40391, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>

GARCIA, D. A.; NICHOLLS, R. S.; ARÉVALO, A.; TORRES, O.; DUQUE, S. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados em gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. **Biomédica**, v. 25, p. 451–463, 2005. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i4.1372>

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 345-355, 1992. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.345>

GENTA, R. M. The immune regulation of intestinal helminthiasis. In: PARADISE, L. J.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. **Enteric Infections and Immunity**. Nova York: Springer, p. 239-252, 1996. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0313-6_13

GIRGIS, N. M.; GUNDRU, U. M.; LOKE, P. Immune regulation during helminth infections. **PLoS Pathogens**, v. 9, e1003250, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003250>

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v. 125 p. 338-341, 2010.

GONÇALVES, A. L.; NUNES, D. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 139, p. 956-961, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.02.015>

GONÇALVES, A. L.; ROCHA, C. A.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES M. R.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 72, p. 79-84, 2012b. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000054>

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, 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 Diseases**, v.70, p. 78-84, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.011>

GONZAGA, H. T.; VILA-VERDE, C.; NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001230>

GRAHAM, B. S.; AMBROSINO, D. M. History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 10, p. 129-134, 2015. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000154>

GRANDO, T. H.; BALDISSERA, M. D.; De SÁ, M. F.; Do Carmo, G.; PORTO, B. C. Z.; AGUIRRE, G. S. V.; AZEVEDO, M.; DE JESUS, F. P. K.; SANTURIO, J. M.; SAGRILLO, M. R.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. **Journal of Immunological Methods**, v. 449, p. 56-61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>

GRENCIS, R. K. Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. **Annual Review of Immunology**, v. 33, p. 201-225, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120218>

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-309, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60036-6)

GRZYWA, R.; LUPICKA-SLOWIK, A.; WALCZAK, M.; IDZI, M.; BOBREK, K.; BOIVIN, S.; GAWEL, A.; STEFANIAK, T.; OLEKSYSZYN, J.; SIENCZYK, M. Highly sensitive detection of cancer antigen 15-3 using novel avian IgY antibodies. **ALTEx**, v. 31, p. 43-52, 2014. <https://doi.org/10.14573/altex.1309181>

HANSEN, P.; SCOBLE, J. A.; HANSON, B.; HOOGENRAAD, N. J. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v. 215, p. 1-7, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00050-7)

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

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 450-454, 1993. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.450>

HIRA, P. R.; AL-ALI, F.; SHWEIKI, H. M.; ABDELLA, N. A.; JOHNY, M.; FRANCIS, I.; IQBAL, J.; THOMPSON, R.; NEVA, F. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, p. 261-270, 2004. <https://doi.org/10.1179/000349804225003299>

HIRATA, T.; UCHIMA, N.; KISHIMOTO, K.; ZAHA, O.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; SAKUGAWA, H.; KINJO, F.; FUJITA, J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 246-249, 2006.

HOCHBERG, N. S.; MORO, R. N.; SHETH, A. N.; MONTGOMERY, S. P.; STEURER, F.; McAULIFFE, I. T.; WANG, Y. F.; ARMSTRONG, W.; RIVERA, H. N.; LENNOX, J. L.; FRANCO-PAREDES, C. High prevalence of persistent parasitic infections in foreign-born, HIV-infected persons in the United States. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1034, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001034>

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

HOOGENBOOM, H. R.; HENDERIKX, P.; de HAARD, H. Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 5-31, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00091-4)

HORIE, K.; HORIE, N.; ADBOU, A.M.; YANG, J.O.; YUN, S.S.; CHUN, H.N.; PARK, C.K.; KIM, M.; HATTA, H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4073-4079, 2004. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73549-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73549-3)

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4569-4582, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.00567-12>

INÊS, E. DE J.; SOUZA, J. N.; SANTOS, R. C.; SOUZA, E. S.; SANTOS, F. L.; SILVA, M. L.; SILVA, M. P.; TEIXEIRA, M. C.; SOARES, N. M. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Tropica**, v. 120, p. 206-210, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.010>

IRVING, M. B.; PAN, O.; SCOTT, J. K. Random peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 314-324, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00208-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00208-8)

JIANG, X.; DIRAVIYAM, T.; ZHANG, X. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) using a human mycoplasma protein. **Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1012-1013, p. 37-41, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.012>

JOURDAN, P. M.; LAMBERTON, P. H. L.; FENWICK, A.; ADDISS, D. G. Soil-transmitted helminth infections. **Lancet**, (*In press*), 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004. <https://doi.org/10.1079/WPS200422>

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 208-217, 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>

KOBAYASHI, C.; YOKOYAMA, H.; NGUYEN, S.V.; KODAMA, Y.; KIMATA, T.; IZEKI, M. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in *scid* mice. **Vaccine**, v. 23, p. 232-235, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.05.034>

KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKAVAT, K.; IELDA, M.; KITA, K.; OHTOMO, H. A. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.518>

KOSUBSKY, L.; ARCHELLI, S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 38, p. 333-338, 2004.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 163-182, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LANZILLOTTI, R.; COETZER, T. L. Phage display: a useful tool for malaria research? **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 18-23, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.09.007>

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v. 10, p. 29-36, 1998. <https://doi.org/10.1080/09540109809354966>

LEI, J. H.; GUAN, F.; XU, H.; CHEN, L.; SU, B. T.; ZHOU, Y.; WANG, T.; LI, Y. L.; LIU, W. Q. Application of an immunomagnetic bead ELISA based on IgY for detection of circulating antigen in urine of mice infected with *Schistosoma japonicum*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 196-202, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.017>

LEU, S. J.; LEE, Y. C.; SHIH, N. Y.; HUANG, I. J.; LIU, K. J.; LU, H. F.; HUANG, S. Y.; YANG, Y. Y. Generation and characterization of anti-alpha-enolase single-chain antibodies in chicken. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, p. 251-260, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.06.001>

LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p. 33-43, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.015>

LEVENHAGEN, M. A.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; CARNEIRO, A. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; GOULART, L. R. Structural and functional characterization of a novel scFv anti-HSP60 of *Strongyloides* sp. **Scientific Reports**, 5, 10447, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep10447>

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

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 7, p. 655-682, 1993.

LIU, L. N.; JING, F. J.; CUI, J.; FU, G. Y.; WANG, Z. Q. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with *Trichinella spiralis* by an IgY-IgM mAb sandwich ELISA. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 150-155, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.001>

LODH, N.; CARO, R.; SOFER, S.; SCOTT, A.; KROLEWIECKI, A.; SHIF, F. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis*: Detection of parasite-derived DNA in urine. **Acta Tropica**, v. 163, p. 9-13, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.014>

LOK, J. B. *Strongyloides stercoralis* and relatives: Recent advances in general and molecular biology. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 194-206, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0033-8>

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

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-155, 1919. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761919000100006>

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 161-164, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000200004>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 52-55, 2001. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4632>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600024>

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.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3892-3899, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3892>

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; 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 Infection Diseases**, v. 40, p. 154-158, 2008. <https://doi.org/10.1080/00365540701558730>

MAHDAVI, A. H.; RAHMANI, H. R.; NILI, N.; SAMIE, A. H.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; JAHANIAN, R. Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia coli* colonization, and immunocompetence of challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 89, p. 484-494, 2010. <https://doi.org/10.1080/00365540701558730>

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 733-744, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1183>

MANHANI, M. N.; RIBEIRO, V. S.; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 322-329, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01283.x>

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. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.020>

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; CANALES, M.; GOTUZZO, E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, p. 35-46, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0150-z>

MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3754, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3749>

MASSEY, H. C. Jr.; BALL, C. C.; LOK, J. B. PCR amplification of putative gpa-2 and gpa-3 orthologs from the (A+T)-rich genome of *Strongyloides stercoralis*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 377-383, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00117-5)

MASSEY, H. C. Jr.; RANJIT, N.; STOLTZFUS, J. D.; LOK, J. B. *Strongyloides stercoralis* daf-2 encodes a divergent ortholog of *Caenorhabditis elegans* DAF-2. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 515-520, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.01.008>

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. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283551dbd>

MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA JÚNIOR, A.; COSTA-CRUZ, J. M. Is there an association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and *diabetes mellitus*? **Acta Tropica**, v. 99, p. 102-105, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.06.006>

MESSIAS, I. J. T.; GENTA, R. M.; MOHREN, W. D. Adherence of monocytes and polymorphonuclear cells to infective larvae of *Strongyloides stercoralis* after complement activation. **Journal of Parasitology**, v. 80, p. 267-274, 1994. <https://doi.org/10.2307/3283757>

MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. **Food and Agricultural Immunology**, v. 13, p. 275-288, 2001. <https://doi.org/10.1080/09540100120094537>

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, 2005, 273 p.

MIRZAEI, M. K.; MAURICE, C. F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 15, p. 397-408, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30>

MOGHADDASSANI, H.; MIRHENDI, H.; HOSSEINI, M.; ROKNI, M. B.; MOWLAVIL, G. H.; KIAL, E. B. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection by PCR detection of specific DNA in human stool samples. **Iranian Journal Parasitology**, v. 6, p. 23-30, 2011.

MONTES, M.; SAWHNEY, C.; BARROS N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, p. 500-504, 2010. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833df718>

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. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.023>

MUKAI, K.; KARASUYAMA, H.; KABASHIMA, K.; KUBO, M.; GALLI, S. J. Differences in the importance of mast cells, basophils, IgE, and IgG versus that of CD4+ T cells and ILC2 cells in primary and secondary immunity to *Strongyloides venezuelensis*. **Infection and Immunity**, v. 85, e00053-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/IAI.00053-17>

MULVEY, G. L.; DINGLE, T. C.; FANG, L.; STRECKER, J.; ARMSTRONG, G. D. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1181-1187, 2011. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.029835-0>

NABEYA, D.; HARANAGA, S.; PARROTT, G. L.; KINJO, T.; NAHAR, S.; TANAKA, T.; HIRATA, T.; HOKAMA, A.; TATEYAMA, M.; FUJITA, J. Pulmonary strongyloidiasis: assessment between manifestation and radiological findings in 16 severe strongyloidiasis cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 320, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2430-9>

NAGESWARAN, C.; CRAIG, P. S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology**, v. 108, p. 335-342, 1994. <https://doi.org/10.1017/S0031182000076174>

NAVARRO, F.; MUNIESA, M. Phages in the human body. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00566>

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. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500003>

NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M. M. The mutual influence of nematode infection and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 90, p. 14-28, 2006.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G. ; PEREIRA, A. T. de M.; FERNANDES, A.; SCHEURMANN, K.; HAMER, F.; SOUZA, A. L.; MARTINS, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow derived cell is essential for the elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.05.005>

NERI, P.; TOKORO, S.; KOBAYASHI, R.; SUGIYAMA, T.; UMEDA, K.; SHIMIZU, T.; TSUJI, T.; KODAMA, Y.; OGUMA, K.; MORI, H.; Specific egg yolk immunoglobulins as a new preventive approach for Shige-toxin-mediated diseases. **PLoS One**, v. 6, p. e26526, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026526>

NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 12 ed., São Paulo: Atheneu, 2011, 546 p.

NGUYEN, H. H., TUMPEY, T. M., PARK, H. J., BYUN, Y. H., TRAN, L. D., NGUYEN, V. D., KILGORE, P. E., CZERKINSKY, C., KATZ, J. M., SEONG, B. L., SONG, J. M., KIM, Y. B., DO, H. T., NGUYEN, T., NGUYEN, C. V. Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. **PLoS One**, v. 5, e10152, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010152>

NIE, G.; WANG, T.; LU, S.; LIU, W.; LI, Y.; LEI, J. Detection of *Clonorchis sinensis* circulating antigen in sera from chinese patients by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. **PLoS One**, 9, e113208, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113208>

NIKBAKHT BRUJENI, G.; JALALI, S. A.; KOOHI, M. K. Development of DNA designed avian IgY antibodies for quantitative determination of bovine interferon-gamma. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 338-345, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9042-9>

NILFOROUSHAN, M.; MIRHENDI, H.; REZAIE, V. S.; REZAIAN, M.; MEAMAR, A.; KIA, E. B. A DNA-based identification of *Strongyloides stercoralis* isolates from Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 36, p. 16–20, 2007.

NOYA. O.; PATARROYO, M. E.; GUZMÁN, F.; ALARCÓN DE NOYA, B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, p. 299-308, 2003. <https://doi.org/10.2174/1389203033487153>

NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**, v. 144, p. 263-273, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000834>

O'CONNELL, E. M.; NUTMAN, T. B. Molecular diagnostics for soil-transmitted helminths. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 508-513, 2016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0266>

ÓLAH, I.; VELVERDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st Edition. Elsevier, 2008, 481p.

OLIVEIRA, L. C. M.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 119-121, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100021>

OLIVEIRA-JÚNIOR, L. C.; ARAÚJO-SANTOS, F. A.; GOULART, L. R., UEIRA-VIEIRA, C. Epitope fingerprinting for recognition of the polyclonal serum autoantibodies of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, 267989, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/267989>

OLSEN, A.; Van LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.; STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J. J.; MAGNUSSEN, P. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 967-972, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.013>

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.; CASTRO, E. D.; 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. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652000000100009>

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, v. 138, p. 1331–1340, 2011. <https://doi.org/10.1017/S003118201100120X>

PAULA, F. M.; SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; GOTTARDI, M.; CORRAL, M. A.; GRYSCHKEK, R. C.; CHIEFFI, P. P. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 141-143, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000200015>

PAULA, F. M.; MALTA, F. M.; CORRAL, M. A.; MARQUES, P. D.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D. M.; YAMASHIRO, J.; PINHO, J. R.; CASTILHO, V. L.; GONÇALVES, E. M.; GRYSCHKEK, R. C.; CHIEFFI, P. P. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients by serological and molecular methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58 p. 1-5, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658063>

PAULY, D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, v. 88, p. 281-290, 2009. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00323>

PEINE, M.; RAUSCH, S.; HELMSTETTER, C.; FRÖHLICH, A.; HEGAZY, A. N.; KÜHL, A. A.; GREVELDING, C. G.; HÖFER, T.; HARTMANN, S.; LÖHNING, M. Stable T-bet(+) GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. **PLoS Biology**, 11:e1001633, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001633>

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

PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; OLIVEIRA JUNIOR, J.; CARVALHO, E. M. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrongiloidiase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 641-649, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600016>

PUTHIYAKUNNON, S.; BODDU, S.; LI, Y.; ZHOU, X.; WANG, C.; LI, J.; CHEN, X. Strongyloidiasis – an insight into its global prevalence and management. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, e3018, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003018>

QU, J. X.; LIN, Y. H.; MA, R.S.; WANG, H. Immunoaffinity purification of polyepitope proteins against *Plasmodium falciparum* with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. **Protein Expression and Purification**, v. 75, p. 225-229, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.003>

RAHBARNIA, L.; FARAJNIA, S.; BABAEI, H.; MAJIDI, J.; VEISI, K.; AHMADZADEH, V.; AKBARI, B. Evolution of phage display technology: from discovery to application. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, p. 216-224, 2017. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1258570>

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 196-203, 1998. <https://doi.org/10.1086/513817>

RAMANATHAN, R.; BURBELO, P. D.; GROOT, S.; IADAROLA, M. J.; NEVA, F. A.; NUTMAN, T. B. A Luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 444-451, 2008. <https://doi.org/10.1086/589718>

RATCLIFFE, M. J. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 101-118, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.018>

REN, H.; YANG, W.; THIRUMALAI, D.; ZHANG, X.; SCHADE, R. A comparative evaluation of six principal IgY antibody extraction methods. **Alternative to Laboratory Animals: ATLA**, v. 44, p. 11-20, 2016.

REQUENA-MÉNDEZ, A.; BUONFRATE, D.; BISOFFI, Z.; MUÑOZ GUTIÉRREZ, J. Advances in the diagnosis of human strongyloidiasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 207-215, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0034-7>

REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrogiloidíase. In: **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 604-613, 2008.

RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; CARDOSO, R.; VIEIRA, C. U.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. **Immunology Letters**, v. 129, p. 94-99, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.01.008>

RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA detection in human neurocysticercosis using different preparations of heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 107, p. 221-225, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1859-1>

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. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000600017>

RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CAMPOS, D. B. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongiloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1209-1214, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0602-z>

RODRIGUES, R. M.; CARDOSO, C. R.; GONÇALVES, A. L.; SILVA, N. M.; MASSA, V.; ALVES, R.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Increased susceptibility to *Strongyloides venezuelensis* infection is related to the parasite load and absence of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 580-586, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.004>

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.

SALEMI, S.; MARKOVIC, M.; MARTINI, G.; D'AMELIO, R. The expanding role of therapeutic antibodies. **International Reviews of Immunology**, v. 34, p. 202-264, 2015. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.863304>

SALLES, B. C.; COSTA, L. E.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C.; VAZ, E. R.; MENEZES-SOUZA, D.; RAMOS, F. F.; DUARTE, M. C.; ROATT, B. M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; TAVARES, C. A.; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, R. L.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 87, p. 219-225, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.012>

SAMPAIO, L. C. L.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; GRESSLER, L.; CAPELETO, D. M.; De SÁ, M. F.; De JESUS, F. P.; DOS SANTOS, A. G. J.; ANCIUTI, A. N.; COLONETTI, K.; STAINKI, D. R.; MONTEIRO, S. G., Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 96-103, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.032>

SARIKAS, A.; HARTMANN, T.; PAN, Z. Q. The cullin protein family. **Genome Biology**, v. 12, p. 220, 2011. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-220>

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 57-62, 1990. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90173-K](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90173-K)

SAUGAR, J. M.; MERINO, F. J.; MARTÍN-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; ORTEGA, S.; GÁRATE, T.; RODRÍGUEZ, E. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. **Acta Tropica**, v. 142, p. 20-25, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.020>

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

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: Global distribution and risk factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2288, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity if alternative adjuvants in comparison to Freund's complete adjuvant. **ALTEX**, v.13, p. 22-25, 1996.

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. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_3

SEGARRA-NEWNHAM, M. Manifestations, diagnosis, and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, p. 1992-2001, 2007. <https://doi.org/10.1345/aph.1K302>

SHARIFDINI, M.; MIRHENDI, H.; ASHRAFI, K.; HOSSEINI, M.; MOHEBALI, M.; KHODADADI, H.; KIA, E. B. Comparison of nested polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods for detection of *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 1285-1291, 2015. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0309>

SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v. 97, 129-138, 1988. <https://doi.org/10.1017/S0031182000066804>

SIDDIQUI, A. A.; BERK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1040-1047, 2001. <https://doi.org/10.1086/322707>

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 211-215, 2005. <https://doi.org/10.1080/00365540410020875>

SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.234-244, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028>

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: GROVE, D. I. (Ed.) **Strongyloidiasis a major roundworm infection of man**. 1 ed. London: Taylor and Francis, p. 11-84, 1989.

SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S.; DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, p. 313-322, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>

STEINMANN, P.; ZHOU, X. N.; DU, Z. W.; JIANG, J. Y.; WANG, L. B.; WANG, X. Z.; LI, L. A.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, e75, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000075>

SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: Importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 173-184, 2006.

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1946-1950, 2011. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4381>

SYKES, A. M.; Mc CARTHY, J. S. A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e955, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000955>

TEIMOORI, S.; ARIMATSU, Y.; LAHA, T.; KAEWKES, S.; SEREERAK, P.; SRIPA, M.; TANGKAWATTANA, S.; BRINDLEY, P. J.; SRIPA, B. Chicken IgY-based coproantigen capture ELISA for diagnosis of human opisthorchiasis. **Parasitology International**, v. 66, p. 443-447, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.10.011>

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, p. 569-574, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)

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. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.005>

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4354, 1979. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

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.

VAN DOORN, H. R.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTEYN, 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.01735-06>

VEGA, C.; BOK, M.; CHACANA, P.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F.; PARRENÕ, V. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p. 156-169, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.003>

VERGOTE, V.; BURVENICH, C.; Van De WIELE, C.; De SPIEGELEER, B. Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach. **Journal of Peptide Science**, v. 15, p. 697-710, 2009. <https://doi.org/10.1002/psc.1167>

VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A.; POLDERMAN, A. M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 342-346, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>

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. <https://doi.org/10.5604/17331331.1197285>

VINEY, M. E.; LOK, J. B. The biology of *Strongyloides* spp. 2015. In: HODGKIN, J.; ANDERSON, P. **Wormbook: the *C. elegans* Research Community**. Disponível em: <<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

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. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)

WEATHERHEAD, J. E.; MEJIA, R. Immune response to infection with *Strongyloides stercoralis* in patients with infection and hyperinfection. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 229-233, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0032-9>

WEN, J.; ZHAO, S.; HE, D.; YANG, Y.; LI, Y.; ZHU, S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. **Antiviral Research**, v. 93, p. 154-159, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.11.005>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What are intestinal worms (soil-transmitted helminthiasis)?** Disponível em: http://www.who.int/intestinal_worms/disease/en/. Acesso em: 26/10/2017.

WU, T. C.; LEI, W. Y.; CHEN, M. C.; HU, C. T. *Strongyloides stercoralis* infection: a health issue regarding indigenous people in Taiwan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 468-472, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.04.004>

YAGUCHI, K.; OHGITANI, T.; NORO, T.; KANESHIGE, T.; SHIMIZU, Y. Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. **Avian Disease**, v. 53, p. 245-249, 2009. <https://doi.org/10.1637/8475-092908-Reg.1>

YOUSIF, A. A.; MOHAMMAD, W. A.; KHODEIR, M. H.; ZEID, A. Z.; EL-SANOUSI, A. A.; SABER, M. S.; REDA, I. M. Oral administration of hyperimmune IgY: an immunoecological approach to curbing acute infectious bursal disease virus infection. **Egyptian Journal of Immunology**, v. 13, p. 85-94, 2006.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 364-371, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02655-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02655-2)

ZHEN, Y. H.; JIN, L. J.; LI, X. Y.; GUO, J.; LI, Z.; ZHANG, B. J.; FANG, R.; XU, Y. P. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 317-322, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.016>