

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS A FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE
Strongyloides venezuelensis NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

Henrique Tomaz Gonzaga

Uberlândia

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS A FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE
Strongyloides venezuelensis NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como parte de
obtenção do título de Mestre.

Henrique Tomaz Gonzaga

Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz

Orientadora

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Coorientador

Uberlândia

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- G642r Gonzaga, Henrique Tomaz. 1987-
Reatividade de anticorpos a frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* no diagnóstico diferencial da estrogiloidíase humana [manuscrito] / Henrique Tomaz Gonzaga. - 2011.
92 f. : il.
- Orientadora: Júlia Maria Costa Cruz.
Coorientador: Jair Pereira da Cunha Junior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Estrogiloidíase - Diagnóstico - Teses. 2. Diagnóstico diferencial - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Cunha Junior, Jair Pereira da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.995.132-071

“Deus é a evidência invisível.”

Victor Hugo

“A ciência é uma coisa maravilhosa
se você não depende dela para viver.”

Albert Einstein

A **Deus**, por me conduzir pelos caminhos da vida e conceder mais essa vitória.

À memória de meu pai, **Reinaldo Gonzaga** e à minha mãe, **Maria Helena Tomaz Gonzaga**, verdadeiros amigos que não mediram esforços para que eu chegasse a mais esta etapa da vida.

Ao meu irmão **Humberto Tomaz Gonzaga**, pelo companheirismo.

À **Priscila Silva Franco**, pelo carinho, incentivo e muita compreensão.

Agradecimentos

À minha família pelo apoio e torcida em todos os momentos de minha vida.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz pela orientação e por acreditar no meu trabalho. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior pelo exemplo de profissionalismo e coorientação nas etapas essenciais da definição e discussão dos experimentos.

À Ms. Vanessa da Silva Ribeiro pelo exemplo de disciplina no trabalho, dedicação e disponibilidade integral.

À Ms. Marianna Nascimento Manhani por compartilhar a ideia de investigar a avidez na *strongyloidíase* humana.

À Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva pela competência e colaboração no delineamento e análise dos experimentos de avidez.

À Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Universidade Estadual de Campinas, por ter cedido a cepa de *Strongyloides venezuelensis*.

Aos Professores Dr. Cláudio Vieira da Silva, Dra. Denise Von Dolinger de Brito, Dra. Michele Aparecida Ribeiro de Freitas, Dra. Heliana Batista Oliveira, Dra. Fabiana Martins de Paula por aceitarem o pedido de avaliação dessa dissertação nas bancas de qualificação e defesa e pelas valiosas contribuições.

A todos os Professores da Pós-Graduação pelo ensino.

Aos colegas alunos dos Laboratórios de Imunologia, Histologia, Genética e Bioquímica pela disponibilidade em auxiliar e ensinar o uso de equipamentos. Só assim conseguimos prosseguir!

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia e de Imunologia, em especial Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, Maria das Graças Marçal e Edilge Gouvêa pela paciência e disposição que sempre demonstraram.

Aos colegas da turma de mestrado por enfrentarem as mesmas situações com experimentos e seminários: Ester Cristina Borges Araujo, Mariana de Resende Damas Cardoso e Silas Silva Santana.

Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Nágilla Daliane Feliciano, Daniela da Silva Nunes e Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves por partilharem da rotina de trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pela publicação da portaria conjunta, nº1, de 15 de julho de 2010, que permite o recebimento de bolsa por alunos de pós-graduação, dedicados às atividades de sua área de formação, especialmente quando se tratar de docência como professores em qualquer nível de ensino.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro para produtos e equipamentos.

Aos que ficaram da 62ª turma de Ciências Biológicas da UFU pela amizade e momentos de convivência!

E a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Classificação e morfologia do gênero <i>Strongyloides</i>	12
1.2 Aspectos do ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	14
1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana	16
1.4 Sintomatologia	17
1.5 Resposta imune do hospedeiro	18
1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase	20
1.6.1 Aidez de anticorpos em testes diagnósticos	23
1.7 Antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da estrogiloidíase humana	25
1.8 Composição proteica e fracionamento antigênico de glicoproteínas de <i>S. venezuelensis</i>	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Aspectos éticos	32
3.2 Amostras de soro	32
3.2.1 Amostras para validação dos testes diagnósticos	32
3.3 Obtenção de larvas filarioides (L3) de <i>S. venezuelensis</i>	34
3.4 Métodos parasitológicos	35
3.4.1 Coprocultura pelo método de Looss	35
3.4.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola e processamento das larvas recuperadas	35
3.5 Produção de extrato de <i>S. venezuelensis</i>	36
3.5.1 Extrato salino	36
3.6 Cromatografia dos extratos salino e alcalino de <i>S. venezuelensis</i>	37
3.6.1 Cromatografia em agarose-concanavalina-A do extrato salino	37
3.7 Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas	38
3.7.1 Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	38
3.8 Testes sorológicos	39
3.8.1 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	39
3.8.1.1 ELISA (ES, FNL Con-A e FL Con-A) para IgG e IgA anti- <i>Strongyloides</i>	39
3.8.1.2 ELISA avidez (ES) para IgG anti- <i>Strongyloides</i>	40
3.8.2 <i>Immunoblot</i> avidez	42
3.9 Análise estatística	44
3.10 Normas de biossegurança	45
4. RESULTADOS	46
4.1 Obtenção das frações de <i>S. venezuelensis</i> não ligante e ligante de Con-A	46
4.2 Detecção de IgG e IgA por ELISA com ES, FNL Con-A e FL Con-A	49
4.3 Aidez de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i>	55
5. DISCUSSÃO	63
5.1 Detecção de IgG e IgA por ELISA com ES, FNL Con-A e FL Con-A	63
5.2 Aidez de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i>	68
6. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- ou + – alto decréscimo na intensidade de reconhecimento (baixa avidéz)
- +, ++ ou +++ – intensidade de reconhecimento: baixa, média ou alta, respectivamente
- ++ ou +++ – baixo decréscimo na intensidade de reconhecimento (alta avidéz)
- % por cento; porcentagem
- (a) – verdadeiro positivo
- (b) – falso positivo
- (c) – falso negativo
- (d) – verdadeiro negativo
- μl – microlitro
- μl – micrômetro
- °C – graus Celsius
- 1D – unidimensional
- 4x – objetiva acromática 4x de aumento
- AUC – *area under curve*; área sob a curva
- BOD – *Biochemical Oxygen Demand*
- C₆H₄(NH₂)₂ – *o*-fenilenodiamina
- CaCl₂ – cloreto de cálcio
- CD4⁺ – *cluster of differentiation*; grupo de diferenciação
- CEP/UFU – Comitê de Ética em Pesquisa/UFU
- CEUA/UFU – Comitê de Ética na Utilização de Animais
- Con-A – concanavalina-A
- cut-off* – limiar de reatividade; ponto absoluto/ótimo de corte
- DAB – diaminobenzidina
- DO – densidade ótica
- DO_{U-} – densidade ótica dos poços não tratados com ureia
- DO_{U+} – densidade ótica dos poços tratados com ureia
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*; ensaio imunoenzimático
- Es – especificidade
- ES – extrato salino total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis*
- FL Con-A – fração ligante de ES obtida em coluna com Con-A
- FNL Con-A – fração não ligante de ES obtida em coluna com Con-A
- g – gravidade
- G1 – grupo com diagnóstico parasitológico positivo para *Strongyloides stercoralis*
- G2 – grupo infectados por outros parasitos intestinais
- G3 – grupo controle de indivíduos saudáveis
- G4 – grupo com sorologia positiva para estrongiloidíase e negativo nos exames coproparasitológicos.
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ – ácido sulfúrico
- HCl – ácido clorídrico
- HIV – *human immunodeficiency virus*; vírus da imunodeficiência humana
- IA – índice avidéz
- IE – índice ELISA
- Ig – imunoglobulina
- IL – interleucina
- kDa – kiloDalton

kHz – kilohertz
 L1 – larva rabditoide de primeiro estágio
 L2 – larva rabditoide de segundo estágio
 L3 – larva filarioide de terceiro estágio
 L4 – larva de quarto estágio
 LR – *likelihood ratio*; razão de verossimilhança
 M – molaridade
 mA – miliamperagem
 mg – miligrama
 MgCl₂ – cloreto de magnésio
 mL – mililitro
 MM – massa molecular
 mm – milímetro
 mM – milimolar
 MnCl₂ – cloreto de manganês
 N – normalidade
 NaCl – cloreto de sódio
 ND – não detecção; não reconhecimento das bandas
 nm – nanômetro
 p – nível de significância
 PAMP – *pathogen-associated molecular pattern*; padrão molecular associado a patógenos
 PBS – *phosphate buffered saline*; solução salina tamponada de fosfato
 PBS-T – PBS contendo Tween 20 a 0,05%
 PBS-TL – PBS-T acrescido de leite desnatado
 PBS-T-U – PBS-T acrescido de 6 M de ureia
 pH – potencial hidrogeniônico
 PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil
 PPP – período pré-patente
 r – teste de correlação de Pearson
 RIFI – reação de imunofluorescência indireta
 ROC – *receiver operating characteristic curve*
 r_s – coeficiente de correlação de postos de Spearman
 SDS – dodecil sulfato de sódio
 SDS-PAGE – eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio
 Se – sensibilidade
 síndrome da
 TA – temperatura ambiente
 TE – tampão de equilíbrio
 TEL – tampão de estoque e lavagem
 TG-ROC – *two-graph receiver operating characteristic curve*
 Th2 – linfócitos T *helper* 2
 TNF – fator necrose tumoral
 Tris – tris(hidroximetil)aminometano
 U⁻ – amostras não tratadas com ureia
 U⁺ – amostras tratadas com ureia 6M
 UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
 UFU – Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalos da avidéz de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> .	47
Tabela 2. Padrão de avidéz de IgG nas reações com antígenos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> por ELISA e <i>immunoblot</i> .	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato salino total de larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em coluna de afinidade agarose concanavalina-A (Con-A).	36
Figura 2. Perfil eletroforético do extrato salino total de larvas filarioides de <i>Strongyloides venezuelensis</i> (ES), fração não ligante de Con-A (FNL Con-A) e fração ligante de Con-A (FL Con-A).	37
Figura 3. Detecção de anticorpos IgG e IGA anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase, outras infecções parasitárias e indivíduos saudáveis por <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) utilizando ES, FNL Con-A e FL Con-A.	39
Figura 4. Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (<i>cut-off</i>), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (<i>area under curve</i> ; AUC) e razão de verossimilhança (<i>likelihood ratio</i> ; LR).	41
Figura 5. Correlação e associação entre níveis séricos de IgG e IgA para extrato ES e frações Con-A.	43
Figura 6. Índice avidéz (IA) obtido de ELISA avidéz IgG <i>Strongyloides</i> -específica em pacientes positivos em reações imunoenzimáticas com eliminação de larvas ou negativos nos exames coproparasitológicos.	45
Figura 7. Comparação entre índices avidéz (IA) calculados no IA de triagem e IA médio.	46
Figura 8. Análise da intensidade da reação no <i>immunoblot</i> avidéz e identificação das bandas antigênicas presentes no ES.	48
Figura 9. <i>Immunoblot</i> avidéz frente ao ES utilizando amostras de soro representativas de casos discrepantes do ELISA avidéz.	50

RESUMO

Strongyloides stercoralis, nematódeo parasita intestinal, é um dos responsáveis pelas infecções parasitárias mais prevalentes em humanos. A detecção precoce previne o desenvolvimento das síndromes clínicas de hiperinfecção e disseminação. Na procura por marcadores de resposta imune na estrongiloidíase, as propriedades antigênicas de componentes glicosilados de *Strongyloides* e o desempenho da avidéz de anticorpos IgG foram testados em imunoensaios. Considerando a importância do imunodiagnóstico da estrongiloidíase e a capacidade de ligação a carboidratos das lectinas, como concanavalina-A (Con-A), foram testados o extrato salino total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* (ES) e suas frações obtidas em coluna com Con-A: não ligante (FNL Con-A) e ligante Con-A (FL Con-A) na detecção de imunoglobulinas (IgG e IgA). A determinação de avidéz de IgG foi realizada para detectar pacientes com estrongiloidíase e caracterizar origens de discrepância entre sorologia e coproparasitologia. Sensibilidade (Se), especificidade (Es), *area under curve* (AUC), *likelihood ratio* (LR) e coeficientes de correlação foram calculados; a análise estatística foi feita pelos testes de Mann Whitney e exato de Fisher. FNL Con-A mostrou os melhores parâmetros diagnósticos para detecção de IgG (Se 95,0%, Es 92,5%, AUC 0,99, LR 12,7) e alta correlação ($r = 0,700$) com o ES. As frações não demonstraram claramente utilidade na detecção de IgA. Índice avidéz (IA) foi calculado para cada amostra de soro considerando: (a) IA de triagem (diluição 1:160) e (b) IA médio a diferentes diluições. Para diferenciar os grupos nos IA de triagem e médio foi estabelecido limiar de 75% ($p < 0,001$). *Immunoblot* avidéz foi auxiliar para a análise de casos discrepantes no ELISA e serviu como ferramenta complementar na identificação de antígenos responsáveis pela maturação da afinidade. Concluiu-se que FNL Con-A demonstrou conter fonte importante de peptídeos específicos eficientes na detecção de IgG no imunodiagnóstico da estrongiloidíase; e o ensaio de avidéz de IgG distinguiu infecção ativa por *S. stercoralis* com eliminação de larvas dos casos suspeitos ou falso positivos.

Palavras-chave: estrongiloidíase; *Strongyloides stercoralis*; glicoproteínas; avidéz; sorodiagnóstico.

ABSTRACT

ANTIBODIES REACTIVITY TO *Strongyloides venezuelensis* ANTIGENIC FRACTIONS IN HUMAN STRONGYLOIDIASIS DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

Strongyloides stercoralis, a human intestinal nematode, causes one of the most common worldwide parasitic infections. Early detection prevines the development of disseminated and hyperinfection syndromes. In search for immune response markers for strongyloidiasis, antigenic properties of glycosylated components from *Strongyloides* and IgG avidity performance were tested in immunoassays. Considering sugar-binding capacity of lectins, as concanavalin-A (Con-A) and immunodiagnosis importance we tested total saline extract of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae (SE) and its fractions obtained in Con-A column: Con-A unbound (Con-A UF) and Con-A bound (Con-A BF) in immunoglobulin detection (IgG and IgA). IgG avidity determination was investigated to detect patients with strongyloidiasis and characterize sources of disagreement between serology and coproparasitology. Sensitivity (Se), specificity (Sp), area under curve (AUC), likelihood ratio (LR), and correlation coefficients were calculated, statistical analyzes were performed by Mann Whitney and Fisher exact test. Con-A UF showed the highest diagnostic parameters for IgG detection (Se 95.0%, Sp 92.5%, AUC 0.99, LR 12.7) and high correlation ($r = 0.700$) with SE. Con-A fractions did not clearly demonstrate usefulness for IgA detection. Avidity index (AI) was calculated to each serum considering: (a) screening AI (serum 1:160) and (b) mean of AI at different dilutions. To differentiate groups at screening and mean AI a value of 75% was established ($p < 0.001$). Avidity immunoblot was auxiliary for ELISA data analysis of discrepant cases and served as a complementary tool for identifying antigens responsible for affinity maturation. In conclusion, the results obtained demonstrate that Con-A UF is an important source of specific peptides efficient to detect IgG in strongyloidiasis immunodiagnosis and IgG avidity assay may distinguish active infection with *Strongyloides stercoralis* larvae output from suspect or false positive cases.

Keywords: strongyloidiasis; *Strongyloides stercoralis*; glycoproteins; avidity; serodiagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação e morfologia do gênero *Strongyloides*

Espécies do gênero *Strongyloides* Grassi (1879) ocorrem na maioria dos mamíferos, mas também em aves, répteis e anfíbios (LEVINE, 1979). No gênero encontram-se parasitos de importância médica e veterinária. Inclui mais de 50 espécies, com duas delas acometendo o intestino do homem: *S. stercoralis*, com distribuição cosmopolita, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais; e *S. fuelleborni* von Linstow (1905) encontrado na África, Filipinas e Ilhas de Nova Guiné, causando a estrongiloidíase ou anguilulose (SPEARE, 1989; PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996). Em murinos cita-se *S. ratti* Sandground (1925) e *S. venezuelensis* Brumpt (1934) como espécies de relevância. *Strongyloides venezuelensis* foi isolado de ratos selvagens e é mantido em roedores de laboratório como modelos experimentais para a estrongiloidíase humana e fonte de obtenção de antígenos heterólogos utilizados no imunodiagnóstico (MACHADO et al., 2003, 2008b; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; RODRIGUES et al., 2007, 2009).

As espécies de *Strongyloides* apresentam duas gerações, uma de vida livre e outra parasitária, com dimorfismo sexual na primeira e a presença de apenas fêmeas na segunda (MORAES, 1948). Seis formas evolutivas: fêmeas partenogenética parasita e de vida livre, macho de vida livre, ovos e larvas rabditoides e filarioides são distintas morfologicamente (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2005).

A fêmea parasita partenogenética tem aspecto filiforme, com a extremidade posterior afilada. A de *S. stercoralis* mede cerca de 2,5 mm de comprimento por 40 µm de largura, enquanto a de *S. venezuelensis* tem até 3,2 mm por 41 µm. Revestimento formado por uma cutícula delgada, com estriações transversais. O

aparelho digestivo é formado por boca trilabiada; esôfago filariforme e longo; intestino simples; e orifício anal na extremidade posterior em posição transversal. Vulva ventral, posicionada no terço médio do corpo; dela parte o útero anfidelfo; seguem-se ovários, que dependendo da espécie são espiralados com o intestino; e ovidutos, com os ovos enfileirados em seu interior; estes órgãos formam o aparelho reprodutor que ocupa até 2/3 do organismo (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

A fêmea de vida livre ou estercoral é fusiforme, com a porção posterior afilada. Tanto a de *S. stercoralis*, quanto a de *S. venezuelensis* são menores que a fêmea partenogenética e medem até 1,2 por 0,07 mm e 1,2 por 130 µm no comprimento e largura, respectivamente. A cutícula é fina e com leves estrias marcando-a transversalmente. Nessa forma evolutiva, o aparelho digestivo também é simples e formado por boca pequena, esôfago curto e rabditoide, intestino simples e ânus próximo à extremidade posterior. O aparelho genital é organizado em vulva na região mediana do corpo, útero anfidelfo, ovários e receptáculo seminal. O número de ovos no interior do útero é maior em relação à fêmea parasita (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

O macho de vida livre possui o corpo afusado e menor que o das fêmeas. Mede 0,7 mm de comprimento por 0,04 mm de largura em *S. stercoralis* e 0,9 mm por 70 µm em *S. venezuelensis*. Tem revestimento similar ao das fêmeas. O sistema digestório é organizado em boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino simples terminando em cloaca na região caudal. A cauda é recurvada ventralmente e apresenta dois espículos copulatórios, sustentados pelo gubernáculo. A genitália é constituída pelos testículos, vesícula seminal e canais deferente e ejaculador (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

As larvas rabditoides são os primeiros estádios larvais (L1 e L2) das espécies de *Strongyloides* e medem de 200 a 300 µm no comprimento. As oriundas das fêmeas estercoral ou parasita são quase idênticas. Elas têm uma cutícula delicada e

hialina recobrando-as. A boca é diminuta e o esôfago é do tipo rabditoide, com dilatações bulbiformes nas extremidades e constrição na parte mediana. O aparelho digestivo é continuado pelo intestino, que termina em abertura anal espaçada da extremidade posterior. Observa-se também um primórdio genital nítido formado por agregado de células (MORAES, 1948; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

Após a segunda muda, as larvas diferenciam-se em L3, que são as larvas filarioides. As L3 são alongadas e finas e medem 0,05 mm de comprimento. Apresentam cutícula fina e estriada e cauda com detalhe entalhado característico. O vestíbulo bucal é curto, o esôfago filarioide e o intestino longo e estreito com ânus posterior. Podem seguir o curso evolutivo em vida livre ou ao penetrar no hospedeiro. Essa diferença acarreta algumas pequenas mudanças na morfologia deste estágio (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

Ovos das fêmeas parasitas e de vida livre assemelham-se, com diferença apenas no tamanho, sendo os da última maiores. São estruturas elipsoides, de parede translúcida que permite visualizar no momento da oviposição o embrião parcial ou totalmente desenvolvido (MORAES, 1948; GROVE, 1996).

1.2 Aspectos do ciclo biológico de *S. stercoralis*

As espécies de *Strongyloides* têm ciclos evolutivos complexos (ANDERSON, 2000; FERREIRA et al., 2007; VINEY; LOK, 2007). A maioria destes helmintos apresenta a habilidade de manter alternando gerações homogônicas ou diretas em etapas parasitárias e heterogônicas ou indiretas em repetidas proles de vida livre. Essas fases são comumente divididas nos ciclos parasitários partenogenético e no sexuado de vida livre, ambos monoxênicos (REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005; THOMPSON et al., 2005).

No ciclo direto os hospedeiros humanos tornam-se infectados por *S. stercoralis* quando L3 penetram ativamente o tegumento – pele ou mucosas da boca e esôfago. As larvas alcançam os vasos sanguíneos ou linfáticos e chegam aos pulmões. Nos capilares pulmonares diferenciam-se em L4, atravessam a membrana dos alvéolos e migram pela árvore brônquica até a faringe. As L4 são então expectoradas, pelo reflexo da tosse que provocam, ou deglutidas. Quando ingeridas atingem o intestino, se instalam na região do duodeno e jejuno, chegando à maturidade como fêmeas partenogenéticas parasitas que iniciam a oviposição (MORAES, 1948; REY, 2001). Os ovos de *S. stercoralis* são eliminados já larvados na mucosa intestinal e eclodem antes da eliminação das fezes. Esse fato torna difícil a visualização deles nas fezes de humanos infectados, a menos que o indivíduo esteja com diarreia grave (COSTA-CRUZ, 2005). O período pré-patente (PPP) – da penetração de L3 a oviposição da fêmea – para *S. stercoralis* em humanos é de aproximadamente a 8-25 dias (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2005).

A infecção ainda pode ocorrer pelos mecanismos de autoinfecção externa ou exógena em que as larvas rabditoides presentes na região perianal de indivíduos infectados diferenciam-se em larvas filarioides infectantes e aí penetram, completando o ciclo direto. Pode ocorrer também autoinfecção interna ou endógena, na qual larvas rabditoides presentes na luz intestinal (íleo ou cólon) de indivíduos infectados diferenciam-se em larvas filarioides. Por meio destes mecanismos a doença pode persistir por meses ou anos, mesmo que não ocorram novas infecções (LIU; WELLER, 1993; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2005).

Autoinfecção interna pode resultar na elevação do número de formas evolutivas de *S. stercoralis* no intestino e pulmões, quadro conhecido como hiperinfecção. Quando a infecção atinge sítios não usuais do ciclo no humano, como órgãos do sistema nervoso, é chamada disseminação (SIDDIQUI; BERK, 2001; COSTA-CRUZ, 2005).

A contaminação do solo por fezes de indivíduos infectados pelo parasito

possibilita a sobrevivência pelo ciclo indireto, desde que o substrato seja arenoso, úmido, aquecido com luz solar indireta e rico em matéria orgânica. No solo, as larvas rabditóides sofrem quatro diferenciações e resultam em machos ou fêmeas de vida livre. O encontro e a cópula destas formas de vida resulta em ovos que desenvolvem em larvas filarióides infectantes (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2005; THOMPSON et al., 2005).

1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana

Parasitose de prevalência mundial, a estrogiloidíase tem distribuição heterogênea e estima-se que entre 30 e 100 milhões de pessoas encontram-se infectadas por *S. stercoralis* (PIRES; DREYER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001; KOZUBSKI; ARCHELLI, 2004; VINEY; LOK, 2007; OLSEN et al., 2009). Entre as infecções causadas por geo-helintos, a estrogiloidíase está entre as seis primeiras. Essa posição refere-se apenas as infecções ativas, uma vez que o número de pessoas potencialmente expostas ou com quadro de infecção sub-clínico é maior (BETHONY et al., 2006; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2007).

Foi definido por Stuerchler (1981 apud PIRES; DREYER, 1993) as regiões mundiais de acordo com a prevalência da infecção por *S. stercoralis*: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). As áreas hiperendêmicas estão situadas, principalmente, entre os trópicos, especialmente nos países em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; FARDET et al., 2007; DEVI; BORKAKOTY; MAHANTA, 2011).

Nas regiões desenvolvidas do mundo, como Sudeste da América do Norte e Europa, as infecções são frequentes em trabalhadores do campo e também têm origem não autóctone em razão dos imigrantes e visitantes de áreas endêmicas (CELEDON et al., 1994; SIDDIQUI; BERK, 2001; MARCOS et al., 2008). Nos países desenvolvidos as

infecções helmínticas, incluindo a estrogiloidíase, podem ser controladas por programas de atenção básica à saúde e medidas de saneamento efetivo. Nos países em desenvolvimento, maiores regiões endêmicas, as helmintíases distribuem-se em larga extensão e mesmo o tratamento anti-parasitário não protege contra a rápida reinfecção (ANTHONY et al., 2007). Devido à baixa incidência em países industrializados o falso diagnóstico e os erros no tratamento médico podem ocorrer (BOULWARE et al., 2007).

No Brasil, a estrogiloidíase tem importância na saúde pública. As maiores taxas de prevalência foram encontradas nos estados do Amapá, Goiás, Rondônia e Minas Gerais (BRASIL, 2010). Em Uberlândia, Minas Gerais, foi reportado 13% de positividade 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)/ síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SILVA et al., 2005); os quatro trabalhos utilizaram os métodos de Baermann-Moraes (1917; 1948) e Lutz (1919). Ainda em Uberlândia, estudos realizados mostraram 3,8% de prevalência de estrogiloidíase em pacientes diabéticos (MENDONÇA et al., 2006), 9,1% em pacientes com câncer gastrointestinal (MACHADO et al., 2008a) e 4,4% em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA et al., 2009), com a mesma metodologia coprodiagnóstica. Esses resultados revelam que a cidade é área hiperendêmica.

1.4 Sintomatologia

Na estrogiloidíase há três possibilidades de evolução da infecção: erradicação, cronicidade e complicação (GENTA, 1992; GROVE, 1996; FARDET et al., 2007).

A maioria dos portadores de *S. stercoralis* são oligo ou assintomáticos. As alterações na estrogiloidíase manifestam-se de acordo com a migração do parasito

pelos órgãos do hospedeiro. Sinais cutâneos, decorrentes da penetração das larvas infectantes, como *larva currens* e urticária inespecífica são manifestações típicas. Os sintomas pulmonares mais comuns caracterizam a síndrome de Löeffler com tosse seca, dispneia e edema. As manifestações gastrointestinais incluem dor abdominal, vômito, náusea, diarreia, emagrecimento e obstipação (COSTA-CRUZ, 2005; LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; FARDET et al., 2007; KAKATI et al., 2011).

Nas formas graves são reportados sinais e sintomas cutâneos, pulmonares e gastrointestinais mais sérios. Na pele podem aparecer exantemas petequiais e purpúricos. O envolvimento pulmonar acarreta em tosse, hemoptise e sibilos decorrentes da migração larval. Nos casos mais graves há a possibilidade de ocorrer broncopneumonia, desenvolver cavitações e abscessos associados às infecções bacterianas. Em relação ao trato gastrointestinal, o caso grave de infecção pelo *S. stercoralis* inclui sinais de esteatorreia, síndrome de má absorção, isquemia mesentérica, enteropatia perdedora de proteínas, íleo paralítico e obstrução intestinal (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996; KEISER; NUTMAN, 2004; VAIYAVATJAMAI et al., 2008).

A cronicidade da infecção por *S. stercoralis* ocasiona exposição constante dos antígenos do parasito aos componentes celulares e humorais do sistema imune. O envolvimento de mecanismos imunológicos no processo fisiopatológico da estrongiloidíase não foi completamente elucidado (FOGAÇA et al., 1990; MACHADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009).

1.5 Resposta imune do hospedeiro

Geralmente agentes infecciosos podem ser divididos em micropatógenos, como as bactérias, e macropatógenos, por exemplo, os helmintos. Diferente da maioria das infecções micropatogênicas, que são agudas e de período curto, infecções

macropatogênicas são prolongadas e crônicas (MAIZELS et al., 1993; MAIZELS; YAZDANBAKHSI, 2003). Helmintos estimulam no hospedeiro resposta dependente de linfócitos T CD4⁺ com perfil Th2 de produção de citocinas. A resposta imune neste perfil é caracterizada pela produção de interleucinas (IL) – IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21 – envolvidas na sinalização das células (OVINGTON; BEHM, 1997; ONAH; NAWA, 2000; MAIZELS, 2003; TURNER et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2005; MONTES et al., 2009). As interleucinas produzidas induzem rápida resposta humoral mediada por anticorpos da classe E (IgE) antígeno-específica e resposta celular mediada por mastócitos, basófilos e eosinófilos (GENTA, 1996; WEINSTOCK; SUMMERS; ELLIOTT, 2005; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006).

No organismo humano desenvolvem-se respostas T-independente com produção de mediadores da inflamação antígeno-inespecífico pelos macrófagos. Estas moléculas são o fator necrose tumoral (TNF) e IL-1 que atuam nas células caliciformes do intestino ao estimularem a proliferação das mesmas com consequente aumento na produção de muco. O muco é secretado na luz intestinal e reveste as fêmeas parasitas, o que previne o estabelecimento na mucosa ou leva à expulsão delas. Assim, proteínas do muco gastrointestinal, as mucinas, são constituintes da primeira linha de defesa do hospedeiro contra os helmintos. As mucinas são glicoproteínas poliméricas ricas em resíduos de aminoácidos que se ligam a sítios para oligossacarídeos presentes no tegumento dos parasitos (MARUYAMA et al., 2000, 2002; ONAH; NAWA, 2000; MACHADO et al., 2005)

Anticorpos das classes IgM, IgA e IgG específicos, além de IgE, também são produzidos pelo hospedeiro humano na resposta imune contra helmintos, incluindo *S. stercoralis*. IgG é a principal imunoglobulina do soro, correspondendo entre 70-75% do total de anticorpos séricos. Entre as subclasses de IgG forma-se, principalmente, IgG1 e IgG4 na elaboração da resposta contra *S. stercoralis* (ATKINS et al., 1999; MACHADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2007). Credita-se à IgG4 o bloqueio na resposta protetora

promovida pela IgE, ou seja, modula as respostas alérgicas IgE-mediadas pela ligação em sítios dos mastócitos (ATKINS et al., 1997, 1999; RODRIGUES et al., 2007). É possível que o aumento nos níveis de IgG4, que se segue às infecções primárias, reduza a expulsão dos parasitos o que permite o estabelecimento das fêmeas parasitas. Dessa maneira, a estrogiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas de hipersensibilidade (IgE-mediadas) para a persistente autoinfecção, com consequente redução dos efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante (ATKINS et al., 1997). No entanto, nos casos de doença disseminada e de imunossupressão, os níveis de IgE podem estar normais (MARCOS et al., 2008).

IgA é o segundo anticorpo mais presente no soro humano e representa a classe mais proeminente nas mucosas e suas secreções. Por causa do ciclo do parasito envolver as mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por imunoglobulina A (ATKINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2005; MOTA-FERREIRA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010). Pacientes com sintomatologia grave tem redução significativa da concentração de IgA e IgM, entretanto, não há alteração nos níveis de IgG (COSTA-CRUZ, 2005).

1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é incerto, pois a maioria dos casos são assintomáticos, ou quando com sintomatologia presente, os sintomas pulmonares e intestinais são comuns às outras parasitoses. Com isso, é necessária a utilização de exames parasitológicos e imunológicos complementares (LIU; WELLER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWAL; GHOSHAL, 2009).

Métodos parasitológicos diretos de diagnóstico consistem no encontro das formas evolutivas de *S. stercoralis*. Os parasitos, menos rotineiramente, podem ser

encontrados em fluidos de aspirado duodenal, lavado brônquico, escarro, urina, esfregaço de sangue periférico e líquido; ou amostras de tecido sólido, como de biópsia de pele e endoscopia do sistema digestório (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; SUDRÉ et al., 2006; VAN DOORN et al., 2007; KAKATI et al., 2011). Esses métodos são associados aos casos graves de *estrongiloidíase*. O diagnóstico definitivo da *estrongiloidíase*, normalmente, é realizado pelo encontro de larvas nas fezes. Entretanto, na maioria dos casos a eliminação de larvas nas fezes é pequena e irregular, o que dificulta a detecção da infecção (LIU; WELLER, 1993; SUDRÉ et al., 2006).

Estudos demonstraram sensibilidade dos exames de fezes com variação de 15 a 24%, com uma amostra, aumentando entre 55 e 78% quando utilizadas três amostras. No intuito de aumentar a sensibilidade do exame coprológico, foram desenvolvidas técnicas de cultivo dos estádios larvais. Elas baseiam-se no desenvolvimento do ciclo indireto de *Strongyloides*, que permite a concentração do número de larvas (LIU; WELLER, 1993). Entre as técnicas de cultura estão a de cultura em papel filtro (HARADA; MORI, 1955) ou em placa de ágar (KOGA et al., 1991; STEINMANN et al., 2007).

Estádios larvais podem ser vistos em exame microscópico por métodos de recuperação de larvas em amostras fecais. Há apenas um relato de recuperação de estágios adultos, fêmeas e machos, em amostras de fezes (HONG et al., 2009). Os métodos de concentração de larvas de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948) e o de Rugai, Mattos e Brisola (1954) são indicados, uma vez que se baseiam no termo e hidrotropismo das larvas. As vantagens desses métodos, além do aumento da sensibilidade, são simplicidade, rapidez de execução e uso de grande volume de material fecal (REY, 2001). Ainda assim, são necessárias sete amostras fecais, colhidas em dias alternados, para se alcançar 100% de sensibilidade (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001). A dificuldade do exame com várias amostras fecais reside no tempo necessário para coleta,

inconveniência para o paciente e resistência do médico em solicitá-lo (HIRA et al., 2004). Deste modo, a falha em demonstrar larvas não pode ser interpretada erroneamente como ausência da infecção (SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995), sendo a próxima abordagem diagnóstica a realização de testes imunológicos (SIDDIQUI; BERK, 2001).

Os métodos de diagnóstico moleculares e imunológicos amplificam o material genético do parasito em amostras fecais ou detectam diferentes classes de imunoglobulinas específicas anti-*Strongyloides* ou coproantígeno. O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o uso de antígeno recombinante de larva filarioide em reação imunoenzimática (RAVI et al., 2002) e, recentemente, padronizou-se reações em cadeia de polimerase para detecção de material genético de *Strongyloides* (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2010) ou de murino (MARRA et al., 2010). Ensaio para detecção de coproantígeno utilizando anticorpos policlonais contra coproantígeno de amostras fecais humanas, adultos de *S. stercoralis* (EL-BADRY, 2009) ou L3 de *S. venezuelensis* (GONÇALVES et al., 2010) foram padronizados.

Os testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e o de imunoeletrotransferência ou *immunoblot* têm sido empregados e são úteis no diagnóstico, na avaliação da resposta imune do humano e em estudos soroepidemiológicos, por terem elevada sensibilidade (ROSSI et al., 1993; LINDO et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1997, 2003; PAULA et al., 2000; MACHADO et al., 2001, 2003; SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; VAN DOORN, 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009; BON et al., 2010; FELICIANO et al., 2010). Além disso, são vantajosos no monitoramento de pacientes submetidos a tratamento anti-helmíntico (BIGGS et al., 2009).

Estudos utilizando RIFI são direcionados para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos com variações: (1) nas preparações antigênicas, como suspensão de larvas ou corte das mesmas em criostato; e (2) no protocolo de montagem das lâminas (COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001, 2003; RIGO et al., 2008;

MOTA-FERREIRA et al., 2009). O ELISA é o mais conveniente, amplamente utilizado atualmente e que tem se verificado sensibilidade e especificidade elevadas (SIDDIQUI; BERK, 2001; VAN DOORN, 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009). A técnica de *immunoblot* é indicada como altamente sensível e específica no reconhecimento de frações proteicas imunodominantes de *Strongyloides* (LINDO et al., 1994; ATKINS et al., 1999; SILVA et al., 2003; RIGO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010). A dificuldade de obtenção da quantidade considerável de *S. stercoralis* para produção dos extratos utilizados nos testes imunológicos fez a necessidade de padronização e utilização de antígenos heterólogos (COSTA-CRUZ et al., 1998; MACHADO et al., 2001, 2003).

1.6.1 Avidéz de anticorpos em testes diagnósticos

Avidéz ou afinidade funcional define o conjunto de forças de ligação entre um anticorpo e um antígeno. É dependente da multivalência do antígeno, fatores não específicos e afinidade. A afinidade dos sítios no anticorpo para ligação ao antígeno aumenta com tempo do desafio antigênico (TIJSSEN, 1985; GUTIERREZ; MAROTO, 1996; KAHN et al., 2009). Durante as infecções primárias, o estímulo antigênico induz, inicialmente, a produção de anticorpos de baixa avidéz. Nos casos crônicos ou de reinfecção, ocorre produção de anticorpos específicos de alta avidéz (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Ensaio baseado na avidéz de anticorpos IgG foram propostos para avaliar as doenças infecciosas quanto à provável etiologia, momento da infecção primária, identificação de período pré-patente e para distinção entre as fases aguda e crônica (GUTIERREZ; MAROTO, 1996). Protocolos utilizando diferentes métodos, como aglutinação, fixação de complemento, RIFI e *immunoblot* foram padronizados, sendo o ELISA a técnica mais utilizada. A dissociação dos anticorpos de menor avidéz dos

antígenos específicos é obtida por diluição da amostra com agentes desnaturantes, como dodecil sulfato de sódio, etanolamina, dietilamina, guanidina e ureia; ou por meio de eluição, após a formação do imunocomplexo, com etapa de lavagem em tampão acrescido de agente desnaturante (TIJSSEN, 1985; GUTIERREZ; MAROTO, 1996; STEWARD; CHARGELEGUE, 1996; BUTLER, 2000; KAHN et al., 2009).

A quantificação da avides tem sido utilizada no diagnóstico de várias infecções, especialmente, nos casos em que a diferenciação de infecções recentes ou crônicas é crucial (DZIEMIAN et al., 2008). A determinação de avides de IgG sérica é útil em doenças parasitárias, incluindo toxoplasmose (CAMARGO et al., 1991; CANDOLFI et al., 2007; BÈLA et al., 2008), esquistossomose (EL ZAYYAT et al., 1998; VIANA; RABELLO; KATZ, 2001; MOSTAFA; AWAD; SHALABY, 2002), hidatidose (STERLA; SATO; NIETO, 1999; STEFANIAK; KACPRZAK; PAUL, 2001), fasciolose (ABOU-BASHA et al., 2000), leishmaniose (REDHU et al., 2006), toxocaríase (HÜBNER; UHLÍKOVÁ; LEISSOVÁ, 2001; RYCHLICKI, 2004; DZIEMIAN et al., 2008) e neurocisticercose (MANHANI et al., 2009). Para esses parasitos testes avides foram desenvolvidos, porém, não há relato na literatura do uso desta metodologia na *estrongiloidíase*.

Anticorpos anti-L3, utilizando antígenos homólogo ou heterólogo, são detectados em mais de 80% dos pacientes copropositivos (COSTA-CRUZ et al., 1998; VAN DOORN, 2007). Esses dados mostraram que o imunodiagnóstico é auxiliar, mas mesmo com altos valores de sensibilidade e especificidade, nem sempre distingue casos de infecção ativa por *S. stercoralis* daqueles casos em que os exames de fezes negativos e a sorologia é positiva (LIU; WELLER, 1993). Dessa maneira, são necessários avanços que facilitem o reconhecimento e diferenciação entre os casos de *estrongiloidíase*, por exemplo, com os métodos que avaliam a avides de anticorpos como marcadores de fase de infecção.

1.7 Antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da estrogiloidíase humana

Espécies de *Strongyloides* já utilizadas como antígenos heterólogos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humanas incluem *S. cebus* Darling (1911), *S. ratti* e *S. venezuelensis* (CAMPOS et al., 1988; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997, 1998; MACHADO et al., 2001, 2003; RODRIGUES et al., 2007). O desenvolvimento e transmissão no gênero *Strongyloides* é similar, o que permite o uso de *S. venezuelensis* e *S. ratti* em modelos experimentais roedores para estudos da estrogiloidíase humana. Estes estudos têm auxiliado, além da padronização de novas técnicas de imunodiagnóstico, nas pesquisas referentes à biologia molecular, terapêutica e aspectos da interação parasito-hospedeiro: ecologia, patologia e imunologia (NORTHERN et al., 1989; ABE; SUGAYA; YOSHIMURA, 1998; COSTA-CRUZ, 2005; FERNANDES et al., 2008; GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; CHIUSO-MINICUCCI et al., 2010; MACHADO et al., 2011).

A composição antigênica de *S. ratti* e *S. venezuelensis* foi comparada com a de *S. stercoralis*. Os estudos mostraram que a sensibilidade e a especificidade não têm diferença estatística significativa quando comparados antígenos homólogo e heterólogo. Isso conferiu segurança e preferência ao uso destas espécies como fontes de antígenos no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ et al., 1997, 1998; MACHADO et al., 2003, 2005, 2008b).

A obtenção de larvas filarioides suficientes de *S. stercoralis* é considerada a principal limitação para o uso do antígeno homólogo no desenvolvimento de ensaios imunológicos. Caso a amostra fecal não provenha de um paciente com hiperinfecção e considerável eliminação de *S. stercoralis* (SIDDIQUI; BERK, 2001), não se consegue número necessário de larvas para preparação antigênica. A consideração dos últimos autores é estendida para a possibilidade de não ocorrer a geração de quantidades de

larvas no processo de coprocultura (LOOSS, 1905 apud NEVES et al., 2005), seja para fazer o preparado antigênico ou para serem inoculadas no cão na manutenção experimental (GROVE; NORTHERN, 1982; GROVE, 1996). Além disso, mesmo com o método de coprocultura descrito, ele esbarra na dificuldade de acomodação e manutenção destes cães experimentalmente infectados. Apesar dos métodos de cultura em placa de ágar e papel filtro (HARADA; MORI, 1955; KOGA et al., 1991) e coprocultura serem sensíveis para o diagnóstico da estrogiloidíase e/ou para obtenção de larvas destinadas aos antígenos e inóculos, há dúvidas sobre a praticidade do uso na rotina laboratorial. São considerados métodos complexos, com demora na obtenção dos resultados e risco de infecção pela manipulação de larvas viáveis de *S. stercoralis* (ANDRADE-NETO; ASSEF, 1996).

Strongyloides ratti e *S. venezuelensis* são parasitos de roedores silvestres, por exemplo, o rato marrom *Rattus norvegicus* Berkenhout (1769), e podem ser favoravelmente mantidos em ratos de linhagens desenvolvidas para uso na pesquisa. Ratos são animais facilmente sustentados em laboratório e eliminam considerável número de ovos nas fezes. A coprocultura não oferece risco de infecção para os manipuladores e o tempo na estufa é reduzido. Assim, pode-se manter a produção de antígeno no laboratório de forma constante e segura (GROVE; BLAIR, 1981; NORTHERN et al., 1989; SATO et al., 1995; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001, 2008b; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; MACHADO et al., 2011).

Outra limitação dos testes sorológicos é a reação cruzada com outros parasitos, atribuída à complexidade antigênica dos helmintos (GAM; NEVA; KROTOSKI, 1987; CONWAY et al. 1993, a,b; LINDO et al., 1994, 1996; ROSSI et al., 1993; SILVA et al., 2003; SUDRÉ et al., 2006). Com esse quadro, a caracterização e identificação de antígenos *Strongyloides*-específicos se fazem necessárias para o incremento da especificidade dos testes, especialmente, nos mais utilizados – ELISA e *immunoblot* (NORTHERN; GROVE, 1987; LINDO et al., 1994). Com baixa quantidade de larvas também

não é possível o fracionamento e análise dos antígenos para métodos sorológicos (ROSSI et al., 1993; RAVI et al., 2002). A disponibilidade de larvas, que podem ser conseguidas em grande quantidade em roedores experimentalmente infectados, facilitará a padronização e uso de testes sorológicos para o diagnóstico individual e em inquéritos epidemiológicos. Deste modo, a obtenção e identificação de frações antigênicas de alta especificidade e sensibilidade, a partir do fracionamento de extratos totais de *S. venezuelensis*, por exemplo, auxiliarão nos estudos sorológicos no diagnóstico da estrogiloidíase.

1.8 Composição proteica e fracionamento antigênico de glicoproteínas de *S. venezuelensis*

As glicoproteínas são proteínas com grupos de carboidratos ligados covalentemente e ocorrem em todos os organismos vivos. Desempenham várias funções, entre elas: transporte de compostos, estruturação da célula, adesão celular e reconhecimento celular, atuam como enzimas e têm papel imunológico como as imunoglobulinas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). A abundância e diversidade de funções desses compostos nos organismos justificam estudos para o entendimento da bioquímica, incluindo o imunodiagnóstico. Glicoproteínas capazes de interagir com lectinas têm sido alvos da pesquisa, devido à afinidade das lectinas para grupos específicos de glicosilações (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; WEST; GOLDRING, 2003; DURHAM; REGNIER, 2006).

Lectinas (do latim *lectus*, 'selecionar') são proteínas ou glicoproteínas que se ligam especificamente à estrutura de carboidratos, ou seja, reconhecem e ligam-se às cadeias laterais de oligossacarídeos. O contingente de carboidratos apresentado nas superfícies celulares ou em componentes solúveis é favorável a essa interação com

lectinas. Não apresentam função catalítica e características estruturais imunológicas e estão disponíveis imobilizadas em suportes cromatográficos, que podem ser usados na separação de compostos glicosilados (LIS; SHARON, 1986; WEST; GOLDRING, 2003). Como ferramenta no imunodiagnóstico, as lectinas têm sido usadas no fracionamento de antígenos glicosilados para o diagnóstico de alergias provocadas por ácaros (ALVES et al., 2008), protozooses (ALMEIDA et al., 1993; GOMES-SILVA et al., 2008) e helmintíases (RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997; MACHADO, 2008; OLIVEIRA, 2008; NUNES et al., 2010).

Concanavalina-A (Con-A) é uma lectina extraída da semente do feijão-de-porco *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) e foi a primeira isolada da família das leguminosas a ter a estrutura sequenciada e revelada por cristalografia (SUMNER; HOWELL, 1936; EDELMAN et al., 1972). A atividade de aglutinação de eritrócitos, inicialmente descrita, atualmente é somada a várias outras aplicações na biologia, como separação de enzimas lisossomais e glicoproteínas (WEST; GOLDRING, 2003). A Con-A tem ampla especificidade e liga-se aos resíduos de manose e glicose, com maior afinidade pelo α -D-manopiranosídeo com os grupos hidroxilas livres nos carbonos C3, C4 e C6 (LIS; SHARON, 1986; NAISMITH; FIELD, 1996; WEST; GOLDRING, 2003). A cromatografia em coluna com essa lectina, além de ser utilizada como um procedimento padrão para demonstrar presença de unidades de oligomanose, é empregada para separar compostos contendo oligossacarídeos complexos mais ramificados (LIS; SHARON, 1986).

Ao caracterizar-se a organização estrutural, por microscopia eletrônica, da cutícula de adultos e larvas de *S. venezuelensis*, foi demonstrado que a superfície tem composição glicídica (MARTINEZ; SOUSA, 1995, 1997). A investigação da adesão de *S. venezuelensis in vitro* e *in vivo* revelou que há secreção de substâncias adesivas mucinosas produzidas pelas glândulas esofágicas (MARUYAMA; NAWA, 1997; MARUYAMA et al., 2000, 2003). Foi comprovado que essas substâncias são necessárias para fixação dos parasitos à mucosa intestinal do hospedeiro, mas são bloqueadas por

glicosaminoglicanos de mastócitos (MARUYAMA et al., 2000). Além disso, a distribuição longitudinal das fêmeas parasitas é influenciada pelos carboidratos sulfatados da mucosa do hospedeiro (MARUYAMA; NAWA; OHTA, 1998; MARUYAMA et al., 2002). As substâncias mostraram perfil de adesão à lectinas de *Helix pomatia* Linnaeus (1758), *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach, , *Grifonia simplicifolia* (DC.) Baill., *Sambucus sieboldiana* (Miq.) Graebn. e *C. ensiformis* – Con-A – indicando natureza glicoproteica (MARUYAMA; NAWA, 1997). Assim, as substâncias glicoproteicas de *S. venezuelensis* têm importância no estabelecimento do parasito e reconhecimento destas substâncias pelo hospedeiro.

Lectinas e enzimas glicolíticas foram empregadas na análise dos comportamentos termo e quimiocinético de *S. rattii*. O entendimento dos movimentos larvais é importante para análise de mecanismos como a penetração na pele do hospedeiro e posterior migração tecidual. Os tratamentos com Con-A e aglutininas de gérmen de trigo e soja alteraram a percepção das pistas ambientais (TOBATA-KUDO; KUDO; TADA, 2005 a,b). Os autores confirmaram os sítios de ligação de Con-A, por lectina-histoquímica, no complexo anfídial, parte do sistema neuro-sensorial. Sugeriram também, que o tratamento com as enzimas alterou parcialmente a função dos receptores glicoproteicos de membrana dos anfídios. Ainda que existam variações moleculares e estruturais nos carboidratos dos termo e quimiorreceptores das várias espécies do gênero, acredita-se que funções similares são mantidas em *S. venezuelensis*.

A composição proteica de *S. venezuelensis* e alterações neste perfil foram investigadas nas mudanças de estádios de larva infectante, nas fezes e no pulmão, e de fêmea partenogenética. Foram encontrados diferentes *spots* entre as formas evolutivas em eletroforese bidimensional (TSUJI et al., 1993). Houve aumento na expressão de um complexo de polipeptídeos entre 16-20 kDa e uma proteína de choque térmico com 70 kDa, com função de termotolerância e transformação de parasitos com ciclo de vida complexo (TSUJI; OHTA; FUJISAKI, 1997). A síntese dessas proteínas, durante a mudança

entre estágios, deve ser crucial para regulação da infectividade do parasito (TSUJI; OHTA; FUJISAKI, 1997). O sistema ubiquitina-proteassoma foi estudado tendo como modelo *S. venezuelensis* para a detecção de atividade proteolítica em preparações de larvas e fêmeas. Foi demonstrado que a atividade da via é regulada durante o desenvolvimento (PAULA et al., 2009). Em relação a larvas L3 de *S. stercoralis* os resultados obtidos de análise proteômica parcial identificou 26 diferentes proteínas, sendo a maioria representada por proteínas associadas à superfície (MARCILLA et al., 2010).

Os protocolos de fracionamento de antígenos totais de espécies de *Strongyloides* já descritos incluem a utilização de técnica cromatográfica e diferentes detergentes. Coluna de cromatografia de interação hidrofóbica *octyl-sepharose* foi utilizada para antígeno salino de *S. venezuelensis* (RIGO et al., 2008). O antígeno de larvas filarioides de *S. stercoralis* foi passado em coluna de gel filtração e as frações foram empregadas em um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos (MANGALI et al., 1991). A separação em frações aquosa e detergente de antígeno salino de *S. venezuelensis* é protocolada com uso de detergente zwitteriônico sintético (RIGO et al., 2008). A aplicação de outros compostos surfactantes para recuperar antígenos de superfície e uso posterior em testes sorológicos é relatada para *S. ratti* e *S. venezuelensis* com detergentes aniônicos (deoxicolato de sódio e dodecil sulfato de sódio) (NORTHERN; GROVE, 1987; NORTHERN et al., 1989), catiônicos (cetrimida) e não-iônicos (Triton X100 e X114) (NORTHERN et al., 1989; FELICIANO et al., 2010). Diferenças quantitativas e qualitativas foram vistas nos perfis antigênicos depois do fracionamento e/ou solubilização com esses procedimentos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar diferentes frações antigênicas de larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis* no imunodiagnóstico diferencial da estrongiloidíase humana.

Objetivos específicos

1. Produzir extrato salino de *S. venezuelensis*;
2. Isolar componentes antigênicos de larvas filarioides de *S. venezuelensis* por cromatografia de afinidade em resina com a lectina concanavalina-A imobilizada;
3. Analisar o perfil eletroforético das frações antigênicas obtidas em gel de poliacrilamida unidimensional (1D);
4. Detectar anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides* por ELISA, frente aos extratos antigênicos obtidos, em amostras de soro para o diagnóstico da estrongiloidíase humana;
5. Avaliar a avidéz de anticorpos IgG séricos anti-*Strongyloides*, por ELISA e *immunoblot*, em amostras de pacientes com liberação de larvas nas fezes e indivíduos positivos em reações imunoenzimáticas para estrongiloidíase e negativos nos exames coproparasitológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz. De acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) o presente projeto foi aprovado sob o registro N° 188/2009. As amostras de soro, dos grupos de estudo, estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, no respectivo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. A manutenção dos espécimes foi aprovada pelo CEP/UFU sob o protocolo de N° 041/2008. A obtenção de *Strongyloides venezuelensis* foi aprovada sob o parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) de N° 075/2008 para o projeto “Manutenção da cepa de *Strongyloides venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar”.

3.2 Amostras de soro

3.2.1 Amostras para validação dos testes diagnósticos

Para validação do extrato total e das frações antigênicas foram utilizadas 160 amostras de soro. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1 – 40 amostras de soros de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *Strongyloides stercoralis*.

Grupo 2 – 40 amostras de soro de pacientes infectados por outros

parasitos intestinais, listadas abaixo.

Com intuito de verificar a possível reatividade cruzada com outros parasitos nos métodos sorológicos, foram utilizadas amostras de soro de pacientes com outras parasitoses. Testes para detecção de anticorpos com antígenos de *Strongyloides* sp. mostraram determinada reação cruzada para helmintos como: *Schistosoma* sp., *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (GAM et al., 1987, CONWAY et al. 1993 a,b; LINDO et al., 1994, 1996; SILVA et al., 2003).

Ancilostomatídeos (n = 8)

Ascaris lumbricoides (n = 8)

Enterobius vermicularis (n = 6)

Giardia lamblia (n = 5)

Schistosoma mansoni (n = 3)

Tenídeos (*Hymenolepis nana* e *Taenia* sp.; n = 3)

Trichuris trichiura (n = 2)

Coinfecção:

A. lumbricoides + ancilostomatídeo (n = 1)

A. lumbricoides + *H. nana* (n = 1)

A. lumbricoides + *G. lamblia* (n = 1)

A. lumbricoides + *T. trichiura* (n = 2)

Grupo 3 – 40 amostras de soro controle de indivíduos saudáveis

Grupo formado por indivíduos sãos e negativos para parasitos intestinais em exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (1919).

Grupo 4 – 40 amostras de soro de indivíduos com sorologia positiva para *estrongiloidíase* e negativos nos exames coproparasitológicos.

Grupo testado em conjunto com o grupo I para análise da avidéz de anticorpos IgG.

3.3 Obtenção de larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* foi isolada de roedor silvestre *Necromys lasiurus* Lund (1840) (Rodentia, Cricetidae) em abril de 1986 e cedida pela Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta do Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil. O parasito é mantido experimentalmente pela infecção em ratos da espécie *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae) da linhagem *Wistar* Greenman & Donaldson (1906), pelo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas, UFU, Minas Gerais, Brasil.

Ovos e larvas rabditoides (L1 e L2) de *S. venezuelensis* presentes nas fezes dos ratos *Wistar* infectados foram mantidas em cultura de carvão mineral por 3 dias a 28°C, segundo Looss (1905 apud NEVES et al., 2005). Após este processo larvas filarioides (L3) foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954). As L3, depois de recuperadas, foram contadas e conservadas a –20°C até o momento das preparações antigênicas.

3.4 Métodos parasitológicos

3.4.1 Coprocultura pelo método de Looss

O material fecal foi cultivado pelo método de Looss (1905 apud NEVES et al., 2005) misturando-se partes iguais de fezes e carvão mineral úmido. Para a mistura foi utilizado béquer, bastão de vidro, luvas descartáveis e recipientes plásticos descartáveis (100 mL). Os recipientes foram cobertos com gaze cirúrgica. As culturas foram colocadas em estufa BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (TE 390, Tecnal, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 28°C e 70% de umidade por três dias. Após este procedimento as larvas foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brisola (1954).

3.4.2 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola e processamento das larvas recuperadas

A recuperação das larvas de *S. venezuelensis*, após a coprocultura pelo método de Looss (1905 apud NEVES et al., 2005), foi baseada no método de Rugai, Mattos e Brisola (1954). Cálices de sedimentação foram preenchidos com água corrente aquecida à temperatura de 40-45°C. Os recipientes de cultura, cobertos com gaze, foram embocados para o interior dos cálices, de modo que a água alcançasse toda a extensão da abertura. O sistema cálice e recipiente foi mantido em repouso por um período de 1 hora. O sedimento com larvas foi coletado com pipeta capilar longa e transferido para tubos de ensaio. Cada tubo de ensaio foi centrifugado a 1.000 x g por 15 minutos e submetido a cinco lavagens em solução salina tamponada de fosfato (PBS) (0,15 M, pH 7,2), durante três minutos para retirada dos resíduos. Após a última lavagem, o sedimento de larvas foi ressuspenso e 10 µl desta suspensão foi diluída e analisada em microscópio óptico de luz em aumentos de 4x, para contagem das larvas filarioides

(Eclipse E200, Nikon Instruments, Melville, EUA). As L3 de *S. venezuelensis*, recuperadas e contadas, foram utilizadas para manutenção da cepa, em ratos experimentalmente infectados, ou foram distribuídas em alíquotas e mantidas a -20°C .

3.5 Produção de extrato de *S. venezuelensis*

3.5.1 Extrato salino

O extrato salino (ES) foi produzido a partir de alíquotas com aproximadamente 250.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*. As larvas foram descongeladas e ressuspensas em 1 mL de PBS. Coquetel de inibidores de proteases foi utilizado e consistiu de 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 1 mM benzamidina, 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina, 2 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina. Depois foram rompidas por criólise em 10 ciclos de banho de nitrogênio líquido (1 minuto; -196°C) seguidos de sonicação (5 minutos; 40 kHz; 37°C). Após esse procedimento larvas inteiras não foram visualizadas em microscópio. O preparado foi incubado sob agitação lenta por 18 horas à 4°C e em seguida, centrifugado a $12.400 \times g$ por 30 minutos a 4°C .

O sobrenadante, extrato salino, foi analisado para dosagem proteica pelo método de Lowry et al., (1951) e dosagem de carboidratos pela reação fenol-ácido sulfúrico (MATSUKO et al., 2005). Foi obtido aproximadamente 1 mL de antígeno com concentração proteica média de $1.500 \mu\text{g/mL}$ e $1.000 \mu\text{g/mL}$ de carboidratos. O extrato salino obtido foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.6 Cromatografia do extrato salino de *S. venezuelensis*

3.6.1 Cromatografia em agarose-concanavalina-A do extrato salino

Extrato salino foi aplicado, para cromatografia de afinidade, à resina de agarose com concanavalina-A imobilizada (Sigma, St. Louis, EUA) para obter as frações não-ligante (FNL Con-A) e ligante (FL Con-A). Preparou-se a solução aquosa da resina para um volume final de 500 μ L, após empacotamento em fluxo lento com tampão de estoque e lavagem (TEL) (1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $MnCl_2$ e 5 mM $CaCl_2$) gelado (2-8°C). A coluna foi utilizada de acordo com as recomendações do fabricante, com modificações. Primeiramente, foi pré-lavada com TEL cinco vezes o volume da coluna; equilibrada com TEL diluído duas vezes em água – tampão de equilíbrio (TE) – (pH 6,5-7,5). Foram aplicados 2 mg de massa proteica de ES diluído em TE em fluxo lento; o conteúdo foi reaplicado seis vezes para a ligação dos glicoconjugados à lectina. FNL Con-A foi coletada em alíquotas de aproximadamente 1 mL e monitoradas quanto à presença de conteúdo proteico pelo método de Bradford (1976). A remoção completa foi feita com TE até que o conteúdo estivesse livre de proteína, quando a leitura atingiu valor próximo ao do tampão.

Procedeu-se a eluição com TE acrescido de α -D-manopiranosídeo (500 mM) (Sigma, St. Louis, EUA) incubado em repouso por 15 minutos. Em seguida a FL Con-A foi coletada e monitorada como descrito. Após o uso, a resina foi lavada com TE para retirada do excesso de açúcar e regenerada com 2-3 ciclos de lavagem em tampão básico (0,1 M Tris, pH 8,5, 0,5 M NaCl) seguido de tampão ácido (0,1 M acetato de sódio, pH 4,5, 1 M NaCl) e estocada em TEL. Ao final, foi estocada em TEL e armazenada a 4°C.

Os tubos, com as frações, foram lidos em espectrofotômetro a 280 nm (432C, FEMTO, São Paulo, Brasil). As alíquotas que formaram os picos de absorbância

foram agrupadas – FNL Con-A e FL Con-A – e armazenadas –20°C. A dosagem proteica foi feita pelo método de Lowry et al. (1951).

3.7 Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas

3.7.1 Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada para analisar perfil proteico do extrato salino e das frações antigênicas de *S. venezuelensis*. As amostras e os padrões de massas moleculares foram submetidos a SDS-PAGE, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

O gel foi preparado em suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical para mini-gel (SE 250, GE Healthcare, Piscataway, EUA). Antes da aplicação no gel, o extrato e as frações foram diluídos em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%) e então submetidos a aquecimento por três minutos em banho-maria. As placas foram acopladas nas cubas contendo tampão de corrida Tris-glicina. A migração dos polipeptídeos ocorreu em corrente de 25 mA e voltagem de 150 V por, aproximadamente, duas horas. Padrão de massa molecular foi utilizado para o cálculo das massas moleculares relativas das bandas proteicas presentes nas amostras.

Geis de pente único foram submetidos à eletrotransferência, conforme descrito no item 3.8.2; geis com os preparados antigênicos foram corados. A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata pelo método de Friedman (1982). O gel foi digitalizado em *scanner* para documentação. Massas moleculares das bandas

polipeptídicas foram estimadas por regressão linear, de acordo com o padrão de massa molecular referência em kiloDalton (kDa), a partir do cálculo da mobilidade relativa.

3.8 Testes sorológicos

3.8.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.8.1.1 ELISA (ES, FNL Con-A e FL Con-A) para IgG e IgA anti-*Strongyloides*

A reação ELISA para detecção de IgG e IgA séricas foi realizada conforme protocolo descrito por Costa et al. (2003), com modificações.

Microplacas de poliestireno foram utilizadas como suporte para a adsorção do antígeno em concentração de 5 µg/mL a um volume final de 50 µL/poço em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6); e mantidas a 4°C, durante 18 horas, em câmara úmida. Depois de sensibilizadas as placas foram lavadas por três ciclos de cinco minutos cada com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). Após as lavagens foi adicionado 50 µL/ poço das amostras de soro diluídas em PBS-T como segue: 1:160 para IgG e 1:40 para IgA (Sigma, St. Louis, EUA). A incubação das amostras de soro ocorreu por 45 minutos a 37°C. Após um ciclo de lavagem, foram adicionados conjugados enzimáticos na seguinte diluição: anti-IgG humana Fc específica, marcada com peroxidase, 1:2000, para detecção de IgG; e anti-IgA humana cadeia alfa-específica, 1:1.000, em ensaios IgA. A placa foi mantida por 45 minutos a 37°C. Em seguida, após outro ciclo de lavagem, a reação foi revelada com solução cromógena de o-fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio (10 mg de $C_6H_4(NH_2)_2$ + 10 µL H_2O_2 30% + 25 mL de tampão citratofosfato 0,1 M pH 5,5). A placa foi mantida por 15 minutos a

temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz, e a reação interrompida pela adição de 25 µL de solução 2 N de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura foi realizada em leitor ELISA (TP Reader, Thermo Plate, Brasil) com filtro de 492 nm.

Os dados foram submetidos à análise pela curva *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC), que avaliou em conjunto os valores de sensibilidade e de especificidade para obtenção com precisão do ponto ótimo (*cut-off*) da reação para cada extrato/fração analisado combinado com a *receiver operating characteristic curve* (ROC) (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995). Os resultados da reatividade dos soros foram expressos em índice ELISA (IE) – valores de absorbância dividido pelo *cut-off* para cada extrato antigênico. Consideraram-se como positivas as amostras com IE > 1,0.

3.8.1.2 ELISA avidéz (ES) para IgG anti-*Strongyloides*

Experimentos preliminares foram realizados para determinar as condições ótimas para o ELISA avidéz, por titulação em bloco dos reagentes – antígenos, soro, agente desnaturante e conjugado. Para avaliação da avidéz de anticorpos partiu-se do princípio da presença de anticorpos IgG detectáveis utilizando uma diluição anterior ao ponto ideal testado no item 3.8.1.1 (1:80), ou seja amostras positivas, dessa maneira foram considerados os grupos I e IV para análise. No ensaio ELISA avidéz para anticorpos IgG anti-*Strongyloides* a reação foi semelhante ao ELISA indireto descrito anteriormente, com uma etapa adicional do método de eluição principal por agente desnaturante (GUTIERREZ; MAROTO, 1996). A padronização do teste foi conduzida conforme protocolo descrito anteriormente (MANHANI et al., 2009), com modificações.

Placas de microtitulação foram sensibilizadas com ES diluído a uma concentração de 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e mantidas *overnight* a 4°C. A seguir foram lavadas por três ciclos de cinco minutos cada com PBS-T. Cada amostra de soro foi diluída na razão dupla seriada, de 1:80 a 1:2560

(1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 e 1:2560), adicionadas às placas em quadruplicata e incubadas por 45 minutos a 37°C. Depois, no primeiro ciclo de lavagem, uma duplicata foi tratada com ureia 6 M diluída em PBS-T (PBS-T-U), seguida de três lavagens com PBS-T; enquanto a outra duplicata passou por quatro lavagens em PBS-T. A primeira solução de lavagem, PBS-T-U ou PBS-T, permaneceu por dez minutos a TA. Adicionou-se o conjugado enzima-anticorpo anti-IgG humana Fc específica, marcada com peroxidase, na diluição 1:2.000 e a placa foi incubada por 45 minutos a 37°C. Por fim, posterior a um novo ciclo de lavagem com PBS-T, a reação foi revelada como descrito acima.

Densidade ótica (DO) foi determinada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm. A média de cada duplicata forneceu resultados dos poços tratados com ureia (DO_{U+}) ou sem ureia (DO_{U-}). Para titulação dos soros, isto é, a definição do último ponto de diluição positiva, foram consideradas as DO_{U-}, como segue. Três amostras de soro de indivíduos saudáveis sem qualquer dado clínico e epidemiológico indicativo de *estrongiloidíase* foram utilizadas como controle negativo da reação. O *cut-off* foi calculado como a média da DO_{U-} dos três controles negativos, acrescido de dois desvios padrão, para cada diluição (BASSI et al., 1991). A reatividade dos soros foi expressa em índice IE. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos e utilizados na análise de avides.

A avides dos anticorpos IgG para cada amostra foi calculada como índice de avides (IA) de acordo com Wiuff et al. (2002), com alterações: IA de triagem e IA médio. De acordo com a literatura, essa abordagem minimiza as possíveis diferenças na avides decorrentes da concentração de anticorpos em cada amostra e permite a determinação do padrão de avides em cada grupo. Inicialmente, foi calculado IA de triagem para cada diluição positiva (IE > 1,0) de acordo com a fórmula: $IA = (DO_{U+ \text{ diluição } x} / DO_{U- \text{ diluição } x}) \times 100\%$. Em seguida, a avides média de cada amostra foi definida como IA médio, interpretado a partir dos IA de triagem obtido de cada diluição positiva (IE > 1,0). Utilizou-se a fórmula: $IA = \text{média } (IA_{\text{diluição } x}) \times 100\%$.

Valores definidos como baixa avides ($IA < 75,0\%$) e alta avides ($IA > 75,0\%$) foram definidos arbitrariamente para distinção das amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *S. stercoralis* dos indivíduos com sorologia positiva para estrogiloidíase e negativos nos exames coproparasitológicos.

3.8.2 Immunoblot avides

Os componentes proteicos do ES foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e a seguir transferidos do gel para membranas de nitrocelulose, de acordo com técnica de Towbin, Staehelin e Gordon (1979). No sistema de eletrotransferência foi acondicionado um *sandwich* com: folhas de papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida e, novamente, folhas de papel de filtro. Todo o *sandwich* foi umedecido em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 39 mM e metanol a 20%) e colocado em cuba semi-úmida de transferência para aplicação de corrente elétrica por três horas. A voltagem foi ajustada em 250 V e a miliamperagem foi calculada pela fórmula da área do retângulo formado pelo *sandwich* de transferência: $mA \text{ de transferência} = \text{base} \times \text{altura} \times 0,8$. Ao término da transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para confirmar as bandas eletrotransferidas. As membranas foram colocadas em cubas apropriadas para a reação de *immunoblot* cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com 1 mL/canaleta de PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (PBS-TL) por duas horas a TA, sob agitação horizontal lenta. Após esse tempo, as membranas foram lavadas com PBS-TL a 1%. As amostras de soro foram diluídas a 1:50 em PBST-TL a 1% e colocadas em duas tiras em volume final de 500 µl/canaleta. Então, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta.

Após as 18 horas as tiras da membrana foram submetidas a seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, como segue. Uma tira foi lavada três vezes com

solução de ureia 6 M diluída em PBS-T (PBS-T-U), seguida de três lavagens com PBS-T; enquanto a outra passou apenas por PBS-T. Subsequentemente, adicionou-se o conjugado enzima-anticorpo anti-IgG humana *whole molecule* (Sigma, St. Louis, EUA), marcada com peroxidase na diluição 1:1500 em PBS-TL a 1%. Após uma hora e 30 minutos sob agitação lenta a temperatura ambiente, as tiras foram submetidas a um ciclo de seis lavagens com PBS-T, com intervalos de cinco minutos. A revelação foi desenvolvida pela adição do substrato peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%) do *kit* SigmaFast™ 3,3 diaminobenzidina (DAB) com metal potencializador (Sigma, St. Louis, EUA) diluído em água deionizada. Após a visualização das bandas antigênicas a reação foi interrompida com água destilada.

Posteriormente, cada tira foi analisada com base no reconhecimento das frações antigênicas pelos anticorpos presentes nas amostras de soro testadas. A massa molecular dos polipeptídeos foi estimada a partir dos valores das massas moleculares dos marcadores, considerando a mobilidade eletroforética relativa; como descrito acima. Os perfis de bandas obtidos para as amostras tratadas (U^+) e não tratadas com ureia (U^-) foram analisados no programa *Image J* versão 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Todas as tiras foram digitalizadas e a imagem transformada para o modo escala de cinza. No programa foram marcadas, pelo mesmo quadrante, e a intensidade das regiões foi calculada pela ferramenta de análise de gel/*blot*. Gráficos com os picos de intensidade, indicativos das bandas detectadas, foram gerados. O *background* da reação foi eliminado pela subtração da área abaixo da base dos picos de intensidade.

A queda da reatividade entre U^+ e U^- foi calculada de acordo com Aguado-Martínez e colaboradores (2005), com modificações. Quatro divisões foram estabelecidas para a intensidade de reconhecimento: não detecção (ND), baixa (+), média (++) e alta (+++). Avidéz dos anticorpos IgG contra as bandas antigênicas de *S. venezuelensis*, obtidas pela análise de imagem, foi estimada: (1) com base nos valores da área de cada pico (U^+ e U^-) e (2) pela comparação visual da intensidade de cada banda antes e depois do tratamento com ureia. Da interpolação desses dois critérios foram designadas duas

categorias: alto decréscimo na intensidade de reconhecimento (– ou +) foi avaliado como baixa avidéz, enquanto baixo decréscimo (++ ou +++) foi avaliado com alta avidéz. Devido à alta variação individual entre o reconhecimento das bandas antigênica a análise focou a classificação final da amostra com base em pelo menos duas bandas. Se duas ou mais bandas fossem avaliadas com alto decréscimo na intensidade – amostra com IgG de baixa avidéz; caso duas ou mais bandas mostrassem pouca alteração no reconhecimento – amostra com IgG de alta avidéz.

3.9 Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados o programa computacional com pacote estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). As variáveis foram analisadas com os testes específicos, paramétricos ou não-paramétricos, segundo a distribuição dos dados. As diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

A detecção de IgG ou IgA utilizando cada preparação antigênica foi analisada em termos de sensibilidade (Se) e especificidade (Es). Os índices foram determinados conforme as formulas previamente descritas (YODEN, 1950). Foram utilizadas as terminologias: verdadeiro positivo (a), verdadeiro negativo (d), falso positivo (b) e falso negativo (c); e as seguintes fórmulas: $Se = [a / (a + c)] \times 100\%$; $Es = [d / (b + d)] \times 100\%$. Construíram-se curvas ROC para descrever índices de eficácia diagnóstica (MARTINEZ et al., 2003). Área sob a curva ou *area under ROC curve* (AUC), índice da acurácia diagnóstica, foi calculada e valores próximos a 1 indicam um teste informativo; valores próximos a 0,5 indicam um teste sem informação diagnóstica (HANLEY; MCNEIL, 1982). Razão de verossimilhança ou *likelihood ratio* (LR), indica qual a probabilidade de pacientes com estrongiloidíase ter um teste específico positivo comparado com pacientes não infectados pelo parasito; foi estimada como $LR = Se / (1 - Es)$.

Correlações entre níveis de cada classe de anticorpo testada, entre as diferentes preparações antigênicas, foram determinadas utilizando os coeficientes de correlação de postos de Spearman (r_s) ou teste de correlação de Pearson (r).

Para comparação da avidéz entre os grupos de estudo, a análise estatística do índice avidéz (IA) foi feita por teste de Mann Whitney (U). Quando comparados os resultados de frequência de IA o teste exato de Fisher foi empregado (SOPELETE, 2005).

3.10 Normas de biossegurança

Os procedimentos de colheita e manuseio dos materiais biológicos e reagentes, como também a utilização dos equipamentos, foram cumpridos de acordo com as normas de biossegurança descrita por Chaves-Borges e Mineo (1997).

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção das frações de *S. venezuelensis* não ligante e ligante de Con-A

Cromatografia de afinidade utilizando resina de Con-A-agarose foi utilizado para fracionar o extrato salino total de *S. venezuelensis* (ES) em duas frações distintas: uma não ligante de Con-A (FNL Con-A) e outra ligante de Con-A (FL Con-A). A Figura 1 representa o cromatograma do ensaio realizado. Em cada tubo foi coletado aproximadamente 1 mL de amostra diluída em tampão, sendo esses lidos por espectrofotometria a 280 nm. Os valores de densidade ótica foram representados em gráfico com dois picos de absorbância. Tubos de 1 a 4 foram misturados e constituíram a FNL Con-A. Tubos de 14 a 18, obtidos após eluição com α -D-manopiranosídeo em tampão, formaram a fração que interagiu por afinidade com Con-A – FL Con-A.

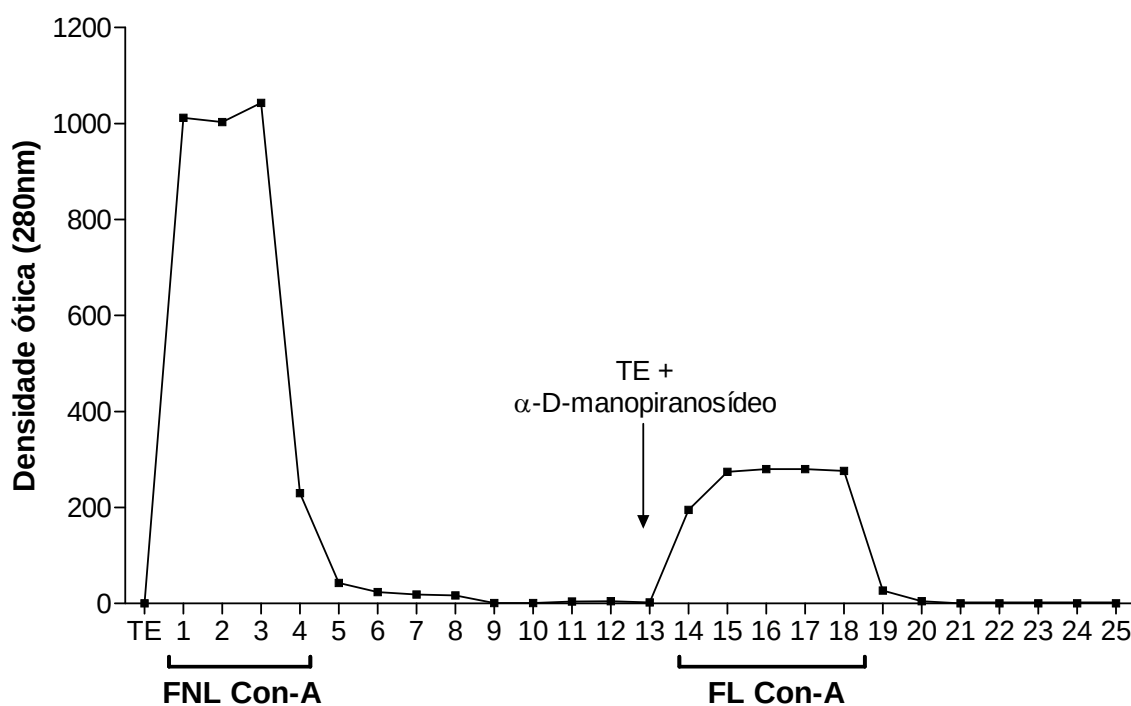


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato salino total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* em coluna de afinidade agarose concanavalina-A (Con-A). 1º pico (1-4) – fração não ligante de Con-A (FNL Con-A) obtida pela lavagem com tampão de equilíbrio (TE). 2º pico (14-18) – fração ligante de Con-A (FL Con-A) eluída com α-D-manopiranosídeo 500 mM em TE.

Os perfis eletroforéticos dos preparados antigênicos ES, FNL Con-A e FL Con-A foram analisados após serem submetidos a SDS-PAGE 15% e corados por nitrato de prata (Figura 2). Foram visualizados componentes proteicos de ES por toda extensão do gel, com massas moleculares aparentes variando de 14 a 150 kDa. Bandas individualizadas ou grupos polipeptídicos foram revelados nas regiões de 131-150, 124, 113, 90, 80, 70, 45, 41, 30, 21 e 14-19 kDa. FNL e FL Con-A tiveram marcações diferenciais e parcialmente complementares. Na FNL Con-A foram vistas bandas variando de 150-14 kDa, com marcação proeminente e distinta da banda de 30 kDa. Enquanto isso, bandas de 131-150, 70 e 30 kDa interagiram por afinidade com Con-A e apareceram na FL Con-A, ainda que com intensidade menor comparada a FNL Con-A.

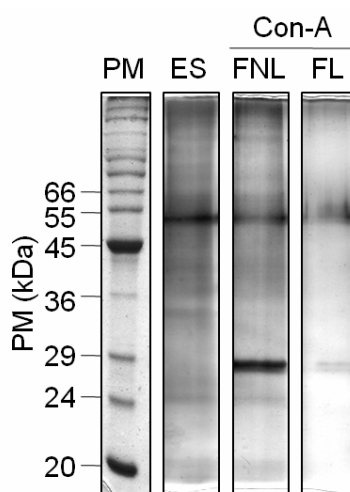


Figura 2. Perfil eletroforético do extrato salino total de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* (ES), fração não ligante de Con-A (FNL Con-A) e fração ligante de Con-A (FL Con-A) em SDS-PAGE a 15%, corado por nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

4.2 Detecção de IgG e IgA por ELISA com ES, FNL Con-A e FL Con-A

Como apresentado na Figura 3 todas as amostras foram testadas por ELISA utilizando ES e frações antigênicas de larvas filarioides de *S. venezuelensis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Con-A. Em relação à IgG e IgA diferentes padrões de reconhecimento foram observados. Média da positividade IgG pelas três preparações antigênicas foi de 89,2% para G1; 9,2% e 12,5% para G2 e G3, respectivamente. Na detecção de IgA anti-*Strongyloides* em G1 a média da reatividade foi 79,2%; em G2 uma média de 10% das amostras mostrou reatividade-cruzada com os diferentes antígenos testados.

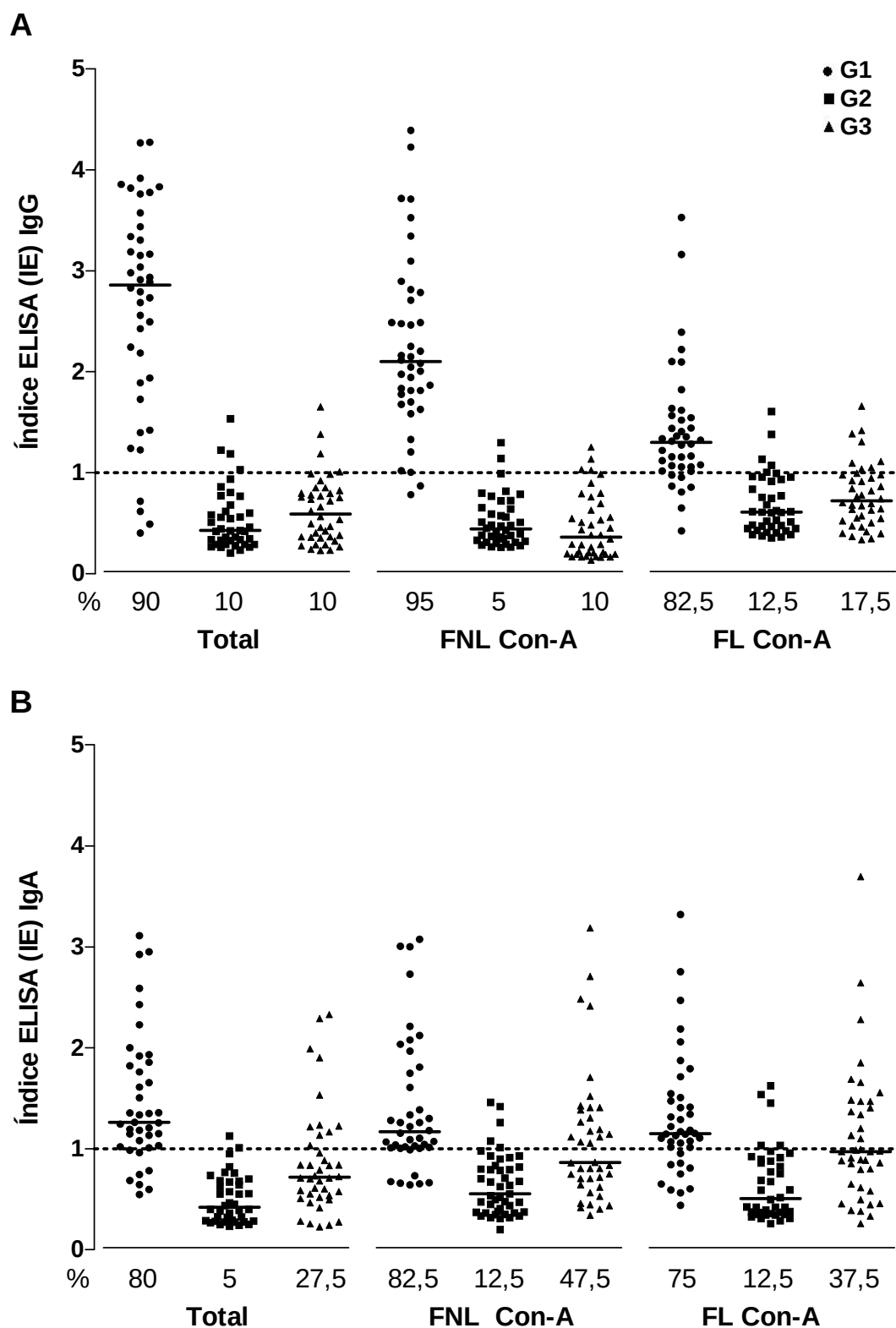


Figura 3. Detecção de anticorpos IgG (A) e IgA (B) anti-*Strongyloides* em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase (G1 • ; n = 40), outras infecções parasitárias (G2 ■ ; n = 40) e indivíduos saudáveis (G3 ▲ ; n = 40) por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) utilizando extrato salino total (ES) de *S. venezuelensis*, e frações não ligante (FNL Con-A) e ligante (FL Con-A) de concanavalina-A. Linha pontilhada indica o *cut-off* (IE = 1,0) e o segmento está na mediana do grupo. *Cut-off* determinado pelas curvas ROC e TG-ROC. % - positividade.

A reatividade cruzada no ELISA IgG em G2 foi devida a *S. mansoni* (1/3 ES e FL Con-A), *E. vermicularis* (1/6 SE e 2/3 FL Con-A), ancilostomatídeos (1/8 ES, FNL Con-A e FL Con-A) e aos casos de coinfeção (1/5 ES, FNL Con-A e FL Con-A). Relativamente à detecção de IgA, houveram reações cruzadas com *T. trichiura* (1/2 FL Con-A), *A. lumbricoides* (1/8 ES e 2/8 FNL Con-A e FL Con-A) e ancilostomatídeos (1/8 ES, 3/8 FNL Con-A e 2/8 FL Con-A).

Coordenadas da curva ROC e a seleção de *cut-off* por TG-ROC permitiriam uma combinação de sensibilidade e especificidade (Figura 4). De acordo com o critério de corte estabelecido por TG-ROC para o ES na detecção de IgG sérica, a sensibilidade e especificidade foram de 90,0%; para FNL Con-A demonstrou aumento na performance: sensibilidade de 95,0% e especificidade de 92,5%. Em suma, para IgA os melhores índices foram conseguidos quando utilizado ES (especificidade de 83,8%) e FNL Con-A (sensibilidade de 82,5%). FL Con-A produziu os parâmetros mais fracos comparados com os outros dos antígenos na detecção de IgG e IgA.

Analisando a curva ROC (Figura 4), FNL Con-A é satisfatoriamente eficiente na discriminação entre pacientes com estrongiloidíase e grupos controle, quando mensurada IgG. A acurácia do teste, indicada pela área sob a curva, mostrou que protocolos para detecção de IgG e IgA com diferentes preparações antigênicas são eficientes e variaram de 0,77 a 0,99. Valores de AUC para detecção de IgG em amostras de soro usando FNL Con-A quase atingiu o valor perfeito (1,00). Mesmo com moderada eficiência, frações Con-A determinaram reatividade cruzada sorológica considerável no G3 no teste ELISA IgA, com índices imprevisíveis, isto é maior que para ES. Esse comportamento explica, de forma parcial, o delineamento da curva.

Cálculo da *likelihood ratio* (LR) conferiu à detecção de IgG a melhor probabilidade de um resultado do ensaio ser relacionado com a existência de estrongiloidíase ou de resposta imune funcional. Para IgA, a LR variou de 2,9 a 5,0 (valores de baixo a moderado). Não há definida uma escala de resultados limiares pra LR. No entanto, quando comparados ES e suas frações obtidas em coluna de Con-A para a detecção de IgG, FNL Con-A teve LR acima de 10, o que assinalou informação diagnóstica excepcional (LR 12,7).

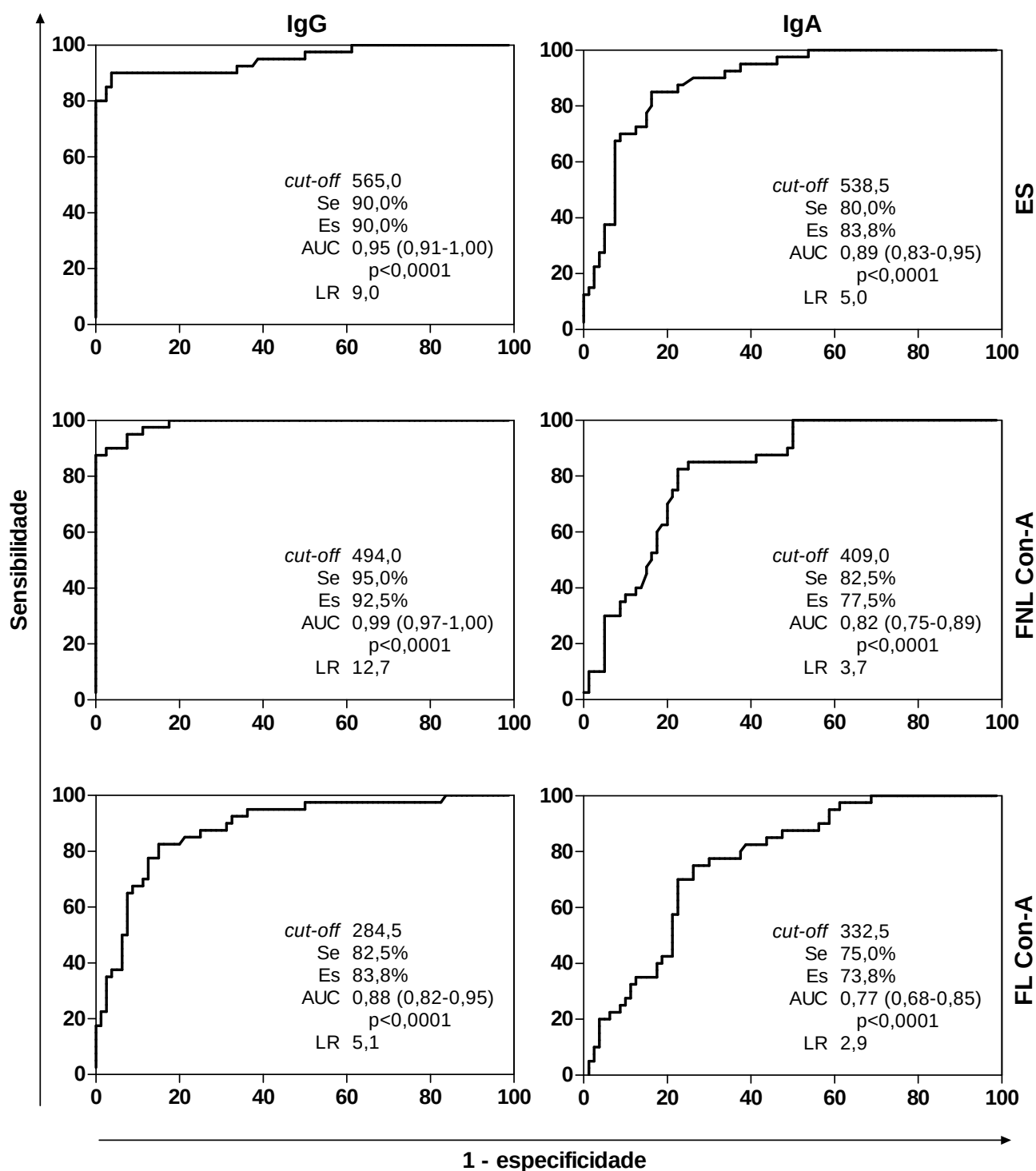


Figura 4. Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*; LR) para extrato salino total (ES) de *S. venezuelensis*, e frações não ligante (FNL Con-A) e ligante (FL Con-A) de concanavalina-A (Con-A) na detecção de IgG e IgA em amostras de soro.

Correlações e associações entre os níveis séricos de IgG ou IgA anti-*Strongyloides* com ES e frações Con-A foram analisados em pacientes de G1. Pacientes com estrongiloidíase tiveram correlação positiva entre os níveis de IgG contra ES e FNL Con-A utilizando o coeficiente paramétrico de Pearson ($r = 0,700$; $p < 0,0001$). Também foi observada baixa associação positiva pra IgA entre FNL Con-A versus FL Con-A ($r_s = 0,387$; $p = 0,014$). Além disso, foi observada 90,0% de frequência de resultados duplo-positivos na detecção de IgG para ES versus FNL Con-A e 80,0% para FL Con-A versus FNL Con-A. Dados de IgA demonstraram moderados coeficientes de correlação, acima de 0,500, nas 3 situações experimentadas: ES versus FNL Con-A e FL Con-A (Figura 5). Associação duplo-negativa foi encontrada pra IgA quando as frações Con-A foram utilizadas (55%).

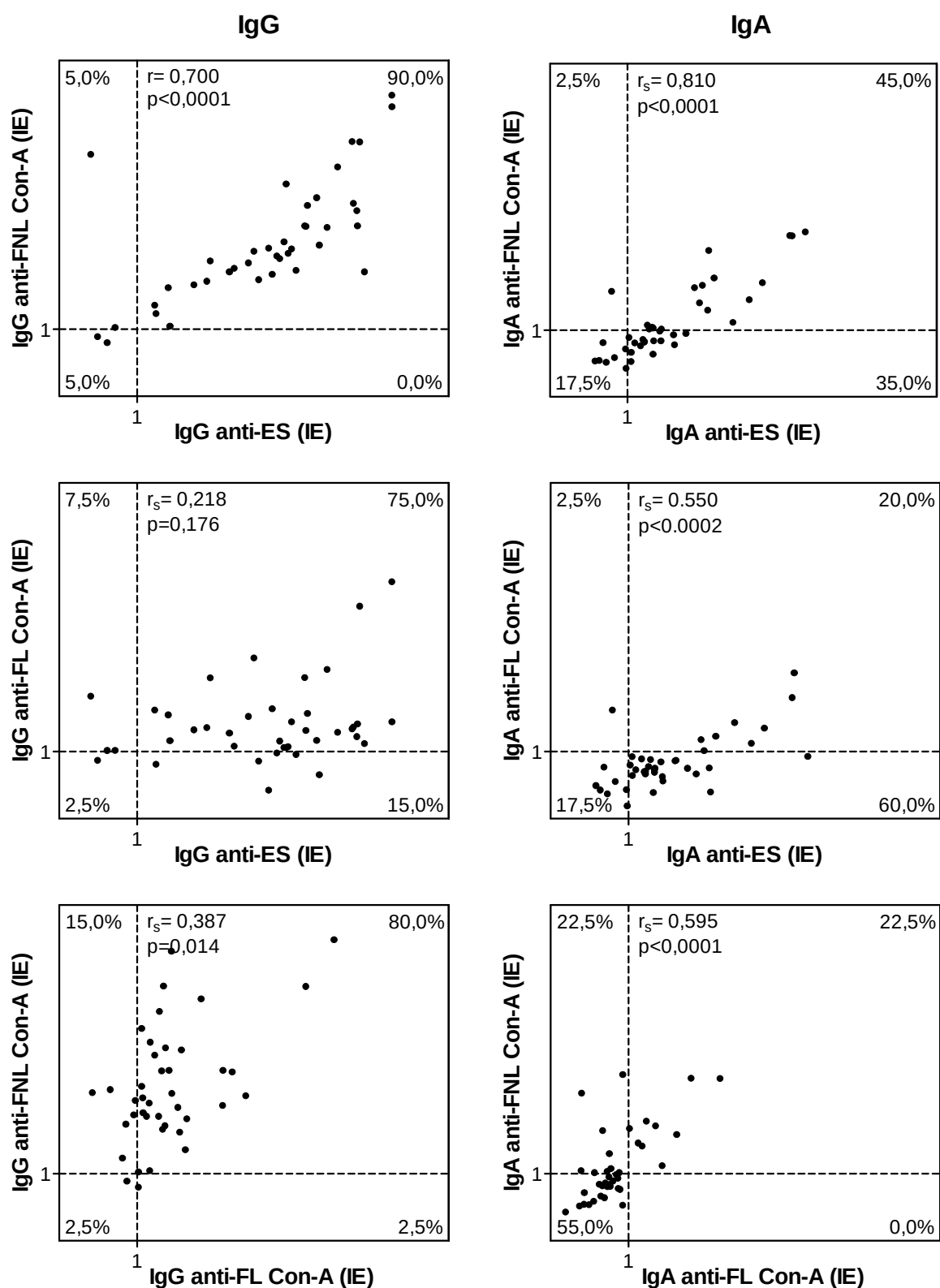


Figura 5. Correlação e associação entre níveis séricos de IgG e IgA para extrato salino total (ES) e frações não ligante (FNL Con-A) e ligante (FL Con-A) de concanavalina-A (Con-A) obtidos a partir de larvas de *Strongyloides venezuelensis*, nos pacientes com estrongiloidíase humana (G1; n = 40). Índice ELISA (IE). Linhas pontilhadas indicam o *cut-off* (IE = 1,0). Coeficiente de correlação de Pearson (r) e Spearman (r_s). Resultados duplo ou simples positivo e negativo são indicados nos quadrantes correspondentes.

4.3 Avidéz de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*

Este estudo incluiu, para análise da avidéz de anticorpos, 80 amostras de soro de indivíduos positivos em reações imunoenzimáticas com antígenos de espécies de *Strongyloides* e com eliminação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes detectável (G1) ou negativos nos exames coproparasitológicos (G4). Anticorpos IgG com maior avidéz foram detectados em G4 nas seis diluições de triagem testadas no processo de titulação das amostras de soro (Figura 6). Índice avidéz (IA) foi maior nos soros de G4 do que em G1 em cada diluição testada ($p < 0,05$; $p < 0,0001$). Também, o IA médio obtido nas diferentes diluições com resultado positivo foi maior em G4 do que em G1 ($p < 0,0001$) (Figura 6).

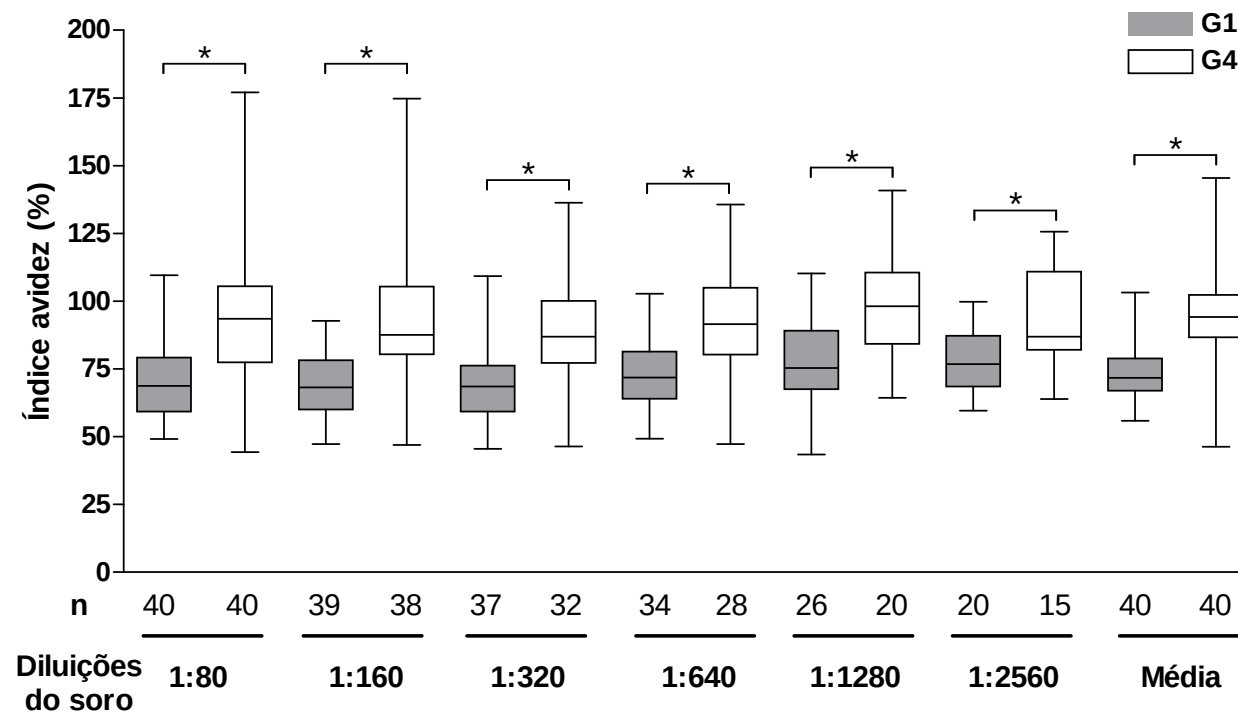


Figura 6. Índice avidéz (IA) obtido de ELISA avidéz IgG *Strongyloides*-específica em pacientes positivos em reações imunoenzimáticas com eliminação de larvas (G1 ■) ou negativos nos exames coproparasitológicos (G4 □). IA foi calculado para cada diluição de soro e a média dos IA obtidos das diferentes diluições que tiveram resultados positivos são mostrados. Dados são apresentados em caixas e barras (*box-and-whisker plot*) com representação de mínimo, quartil inferior (25-50%), mediana, quartil superior (50-75%) e máximo. Significância estatística foi calculada pelo teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$). n – número de amostras analisadas em cada condição.

O melhor IA de triagem correspondeu à diluição do soro na proporção de 1:160, na qual foi observada a máxima diferenciação entre os pacientes de G1 e G4. Nesse ponto, o IA variou de 47% a 93% (mediana 68%) nos soros de G1, e de 47% a 175% (mediana 88%) no painel sérico testado de G4 ($p < 0,0001$). Tais índices, na forma de dispersão dos pontos amostrados, são representados na Figura 7.

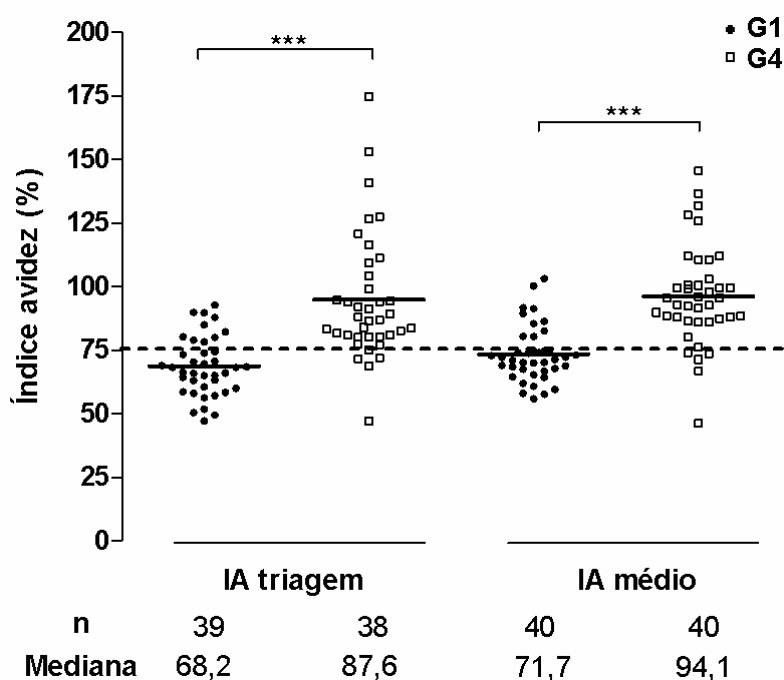


Figura 7. Comparação entre índices avidéz (IA) calculados no IA de triagem (soro diluído na concentração de 1:160) e IA médio de diferentes diluições séricas com resultado positivo na titulação das amostras. IA foi obtido de ELISA avidéz IgG *Strongyloides*-específica em pacientes positivos em ensaios de imunodiagnóstico com eliminação de larvas (G1 ●) ou negativos nos exames coproparasitológicos (G4 □). Linha pontilhada indica o limiar para diferenciação entre os grupos (IA = 75%). Barras horizontais indicam a mediana. Diferença estatística calculada pelo teste de Mann-Whitney ($***p < 0,0001$).

Como IA limiar de distinção, foi observado que um valor de 75% pode ser estabelecido para a melhor diferenciação dos grupos 1 e 4. Amostras com IA < 75% foram, predominantemente, encontradas em G1, enquanto amostras com IA > 75% foram, significativamente, detectadas em pacientes de G4 ($p < 0,0001$). A Tabela 1 sumariza a frequência das amostras de soro nos grupos testados em cada intervalo de avides.

Tabela 1. Intervalos da avides de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em pacientes positivos nos testes sorológicos com eliminação de larvas nas fezes (G1) ou sem eliminação de larvas nos espécimes fecais (G4).

Índice avides (IA)	Grupos de pacientes	
	G1	G4
IA de triagem ^a	n = 39	n = 38
>75%	13 (33,3%)	32 (84,2%) ^{***}
<75%	26 (66,7%) ^{***}	6 (15,8%)
IA médio	n = 40	n = 40
>75%	10 (25,0%)	35 (87,5%) ^{***}
<75%	30 (75,0%) ^{***}	5 (12,5%)

^a IA de triagem foi calculado baseado na diluição de triagem das amostras de soro em 1:160 de acordo com a fórmula $IA = (DO_{U+} / DO_{U-}) \times 100\%$.

^{***} Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$, teste exato de Fisher).

Ensaio de *immunoblot* avides foram realizados para integrar os dados de avides obtidos por ELISA, especialmente, em alguns casos com resultados fora do *cut-off*. Buscou-se esclarecimento, dentro dos grupos analisados, sobre pontos discrepantes de IA no ELISA.

A reação foi conduzida com dez amostras de soro, sendo cinco de cada grupo. As tiras de membrana de nitrocelulose com ES, após a reação, foram analisadas em *software* computacional de imagem para identificação das bandas e análise da intensidade da marcação antes e depois do tratamento com ureia (Figura 8).

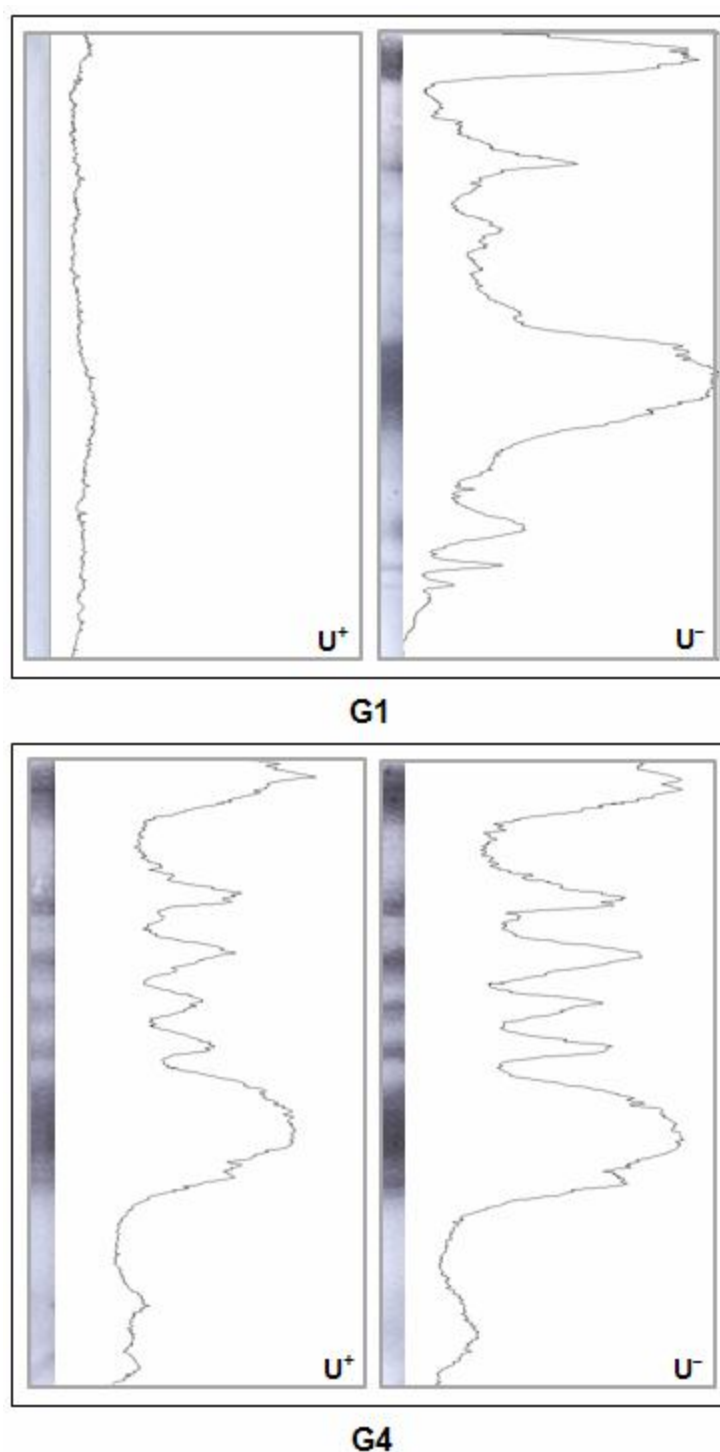


Figura 8. Análise da intensidade da reação no *immunoblot* avides e identificação das bandas antigênicas presentes no extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* (ES). Picos de intensidade, indicativos das bandas detectadas, foram gerados pelo programa de imagens *Image J* versão 1.44. A avides de anticorpos IgG para os componentes do ES foi calculada pela queda da reatividade da tira submetida ao tratamento com ureia (U^+) quando comparada a amostra sem tratamento (U^-). G1 – pacientes positivos no soro e com eliminação de larvas nas fezes. G4 – pacientes positivos na sorologia e negativos nos exames de coproparasitológicos.

Os *immunoblots* avides são demonstrados com o perfil de reconhecimento de bandas antigênicas antes e após o tratamento com as tiras tratadas ou não com ureia na Figura 9. Com o painel de soros testados oito bandas ou intervalos foram reconhecidos: 120-150, 65-70, 52-55, 45, 41, 35-28, 21 e 19 kDa. A intensidade da marcação nas tiras controle, sem tratamento com ureia, nas diferentes regiões polipeptídicas foram classificadas quanto a não detecção (ND) ou detecção baixa (+), média (++) ou alta (+++). Avides de IgG anti-bandas de *S. venezuelensis* reconhecidas estão sumarizadas na Tabela 2. Foi observada alta queda de reatividade nas bandas reconhecidas por soros de pacientes de G1 que tiveram no ELISA IA de triagem ou médio maior que o *cut-off* estabelecido de 75%. O alto decréscimo na intensidade em pelo menos duas bandas (exceto o caso 4 que reconheceu apenas uma banda) classificou todas as amostras de G1 como de baixa avides (–; +). Inversamente, nos soros de G4 foi notado baixo decréscimo consistente na intensidade das bandas, sendo avaliadas como de alta avides (+; ++).

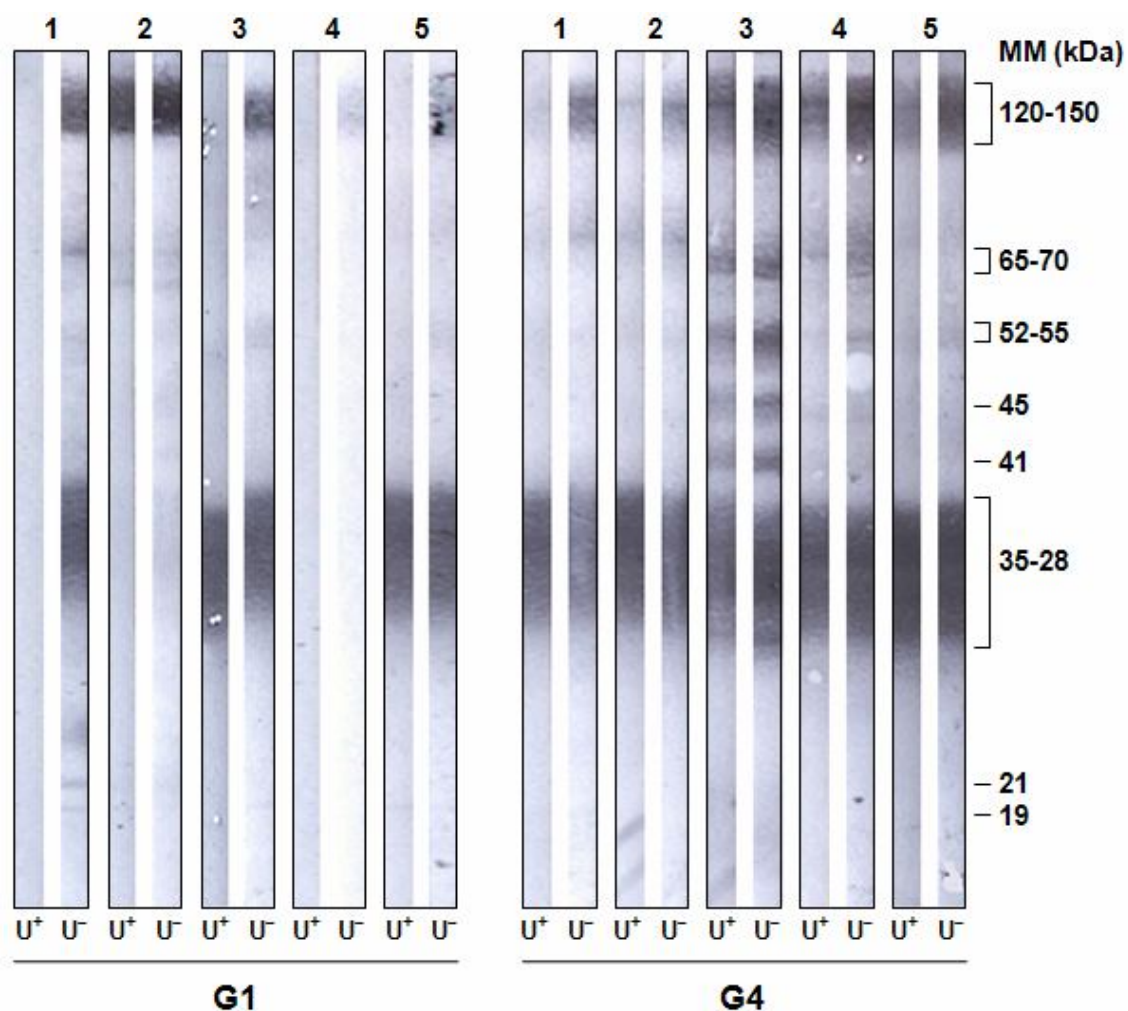


Figura 9. *Immunoblot* avides frente ao extrato salino total de *Strongyloides venezuelensis* (ES) utilizando amostras de soro representativas de casos discrepantes do limiar estabelecido para o índice avides ELISA (IA = 75%) do grupo de pacientes com IgG *Strongyloides* específica detectada no soro e eliminação de larvas nas fezes (G1) ou negativos no exame parasitológico de fezes (G4). A avides de IgG para os componentes do ES foi calculada pela comparação entre amostra submetida ao tratamento com ureia 6 M (U⁺) e amostra sem tratamento com ureia (U⁻). Massa molecular (MM) em kiloDaltons (kDa) do perfil de regiões antigênicas reconhecidas.

Tabela 2. Padrão de avides de IgG nas reações com antígenos de *Strongyloides venezuelensis* por ELISA e *immunoblot* em dez casos discrepantes do limiar estabelecido para o índice avides ELISA (IA = 75%) no grupo de pacientes positivos nos testes sorológicos com eliminação de larvas nas fezes (G1) ou negativos nos exames coproparasitológicos (G4) testados no *immunoblot*.

	ELISA		Immunoblot							
	Índice avides (%)		Decréscimo na intensidade de reconhecimento ^b							
	Casos	de triagem ^a	médio	MM (kDa)						
G1	1	92,74	103,14	–	–	–	–	–	–	–
	2	87,83	91,36	+++	+++	–	–	–	+	
	3	84,93	89,32	–	+	++	–	–	+++	++
	4		100,23	–						
	5	89,77	85,42	–	++	+			+++	+++
G4	1	74,88	80,17	++	++	+++			+++	
	2	71,43	73,96	++	+++	++			+++	+++
	3	69,57	71,34	+++	+++	+++	++	++	+++	
	4	68,75	79,05	+++	++	+++	++	++	+++	
	5	46,93	46,24	+++	++	+++			+++	

^a IA de triagem foi calculado baseado na diluição de triagem das amostras de soro em 1:160.

^b Categorias de decréscimo na intensidade de reconhecimento:

– e + indicam bandas com baixa avides com alto decréscimo

++ e +++ indicam bandas com alta avides com baixo decréscimo

MM: massa molecular. kDa: kiloDaltons.

5. DISCUSSÃO

5.1 Detecção de IgG e IgA por ELISA com ES, FNL Con-A e FL Con-A

O diagnóstico atual da estrogiloidíase humana depende primariamente da detecção de larvas nas fezes e é comumente auxiliado pela detecção de anticorpos específicos no soro (SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWAL; GHOSHAL, 2009). Uma limitação da sorologia é a reatividade cruzada quando se utiliza extratos antigênicos totais. Epítomos glicosilados em preparados antigênicos são diretamente relacionados às reações inespecíficas em testes imunodiagnósticos para detecção de IgG em doenças parasitárias como esquistossomose (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000), neurocisticercose (NUNES et al., 2010) e leishmaniose (GOMES-SILVA et al., 2008).

Testes ELISA para detectar anticorpos séricos anti-*S. stercoralis* complementam os exames coproparasitológicos para encontro de larvas. Além disso, representam ferramenta útil na avaliação laboratorial de pacientes de risco, como os imunocomprometidos (SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995). Vários estudos confirmam que a detecção de casos positivos é aumentada quando ambos os exames são utilizados (CONWAY et al., 1993; COSTA-CRUZ et al., 1998; ROSSI et al., 1993; SUDARSHI et al., 2003; VAN DOORN, 2007). Isto não é imprevisível uma vez que técnicas complementares de diagnóstico empregadas, simultaneamente, maximizam a sensibilidade diagnóstica (SACKETT et al., 1991).

Técnicas de purificação de extratos larvais de *Strongyloides*, já descritas, incluem o uso de técnicas cromatográficas (MANGALI et al., 1991; RIGO et al., 2008). Este estudo foi o primeiro a aplicar lectinas, como Con-A. Devido à afinidade por componentes com resíduos de carboidratos, as lectinas são frequentemente utilizadas na obtenção de extratos glicosilados (WEST; GOLDRING, 2003; ALVES et al., 2008; GOMES-

SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2010). Lectinas foram usadas para obtenção e avaliação de frações antigênicas glicosiladas em alergias (ALVES et al., 2008), protozooses (ALMEIDA et al., 1993; GOMES-SILVA et al., 2008) e helmintíases (RODRIGUEZ-CANNUL et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2010; NUNES et al., 2010).

Concavalina-A é uma lectina vegetal com sítios de ligação, principalmente, a α -D-manose, além de outros resíduos relacionados, como a β -D-glicose (LIS; SHARON, 1986; NAISMITH; FIELD, 1996; WEST; GOLDRING, 2003). Dessa forma, em pesquisas relacionadas à imunologia e bioquímica, Con-A tem sido empregada com o objetivo de estudar as funções e processos biológicos de reconhecimento e isolamento em que componentes glicosilados estão envolvidos (MARUYAMA; NAWA, 1997). Assim, as lectinas são ferramentas convenientes no imunodiagnóstico e para pesquisa da resposta imune do hospedeiro. Considerando o descrito acima, nesse estudo o extrato salino total de larvas filarioides de *S. venezuelensis* foi fracionado por cromatografia de afinidade, com resultados satisfatórios, utilizando a resina agarose-Con-A.

Caracterização parcial das FNL Con-A e FL Con-A por eletroforese unidimensional revelou um perfil de componentes parcialmente complementar ao ES total de larvas de *S. venezuelensis*. Na FNL Con-A, os componentes proteicos apresentaram massa molecular variando de 150-14 kDa, procedentes de proteínas com resíduos de carboidratos com maior afinidade à Con-A. Alternativamente, na FL Con-A bandas de 131-150, 70 e 30 kDa interagiram por afinidade com Con-A. Bandas polipeptídicas que estavam presentes no ES antes do fracionamento foram visualizadas nas duas frações, ainda que algumas regiões não tivessem mesma intensidade de marcação. Fatores como a diluição no tampão, seguida de perda nos tubos coletores, possivelmente, levaram a não resolução das bandas com a coloração por nitrato de prata. Ainda, a provável afinidade diferencial dos diversos componentes à resina de Con-A, em uma mesma região de massa molecular aparente, acarretou na menor marcação em uma das frações.

A ocorrência similiar de algumas regiões polipeptídicas não confirma que estes componentes tenham a mesma composição química. Pressupõe-se que FL Con-A é constituída de moléculas com estruturas glicídicas ligantes de Con-A, enquanto os elementos da FNL Con-A podem ser proteínas com porções glicosiladas não ligantes da lectina testada e/ou peptídeos comuns. O procedimento de cromatografia sequencial em diferentes lectinas permitirá melhor caracterização da natureza dos componentes glicídicos das frações testadas (CUMMINGS; KORNFELD, 1982; LIS; SHARON, 1986; AEED et al., 1998; DURHAM; REGNIER, 2006).

Dados de ELISA demonstraram perfil diferencial da detecção de IgG contra as três frações antigênicas testadas. FNL Con-A exibiu aumento na sensibilidade e especificidade, enquanto a FL Con-A teve os parâmetros diagnósticos mais baixos. Isso indicou que diferentes epítomos podem ser reconhecidos e a IgG gênero específica pareceu ligar-se menos a epítomos glicosilados contendo resíduos de manose. Do mesmo modo, a *likelihood ratio* (LR) confirmou que FNL Con-A teve desempenho excelente para detectar IgG em pacientes com esrongiloidíase. Como proposto por Jaeschke et al. (1994), valores de LR acima de 10 praticamente confirmam o diagnóstico da doença.

A alta correlação e associação significantes encontradas no G1 entre ES e FNL Con-A para detecção de IgG indicaram que esta fração contém antígenos principais envolvidos na resposta imune da esrongiloidíase, uma vez que 90,0% dos pacientes de G1 reagiram aos dois extratos. Mesmo que parcialmente caracterizada, a FNL Con-A teve menor reação cruzada com soros de pacientes com outras doenças parasitárias. Um dos possíveis fatores responsáveis pela reatividade cruzada residual é a manutenção de resíduos de carboidratos não ligantes de Con-A em glicoproteínas ou glicopeptídeos não fracionados.

Os resultados de IgG e IgA indicaram padrões de reconhecimento diferentes, uma vez que a resposta dos isotipos são direcionadas contra grupos distintos de antígenos (GENTA; FREI; LINKE, 1987; ATKINS et al. 1999). Frações de antígeno salino

de *S. venezuelensis* obtidas por cromatografia de afinidade com Con-A não demonstraram claramente aplicação para a detecção de IgA em pacientes com estrongiloidíase humana (G1). Correlação entre ES e frações Con-A nesse grupo sugerem que as larvas não são fontes de peptídeos específicos para testes de IgA sérica.

Alguns estudos focaram na avaliação da resposta IgA na estrongiloidíase humana (GENTA et al. 1987; ROSSI et al., 1993; ATKINS et al. 1999; COSTA et al., 2003; MOTA-FERREIRA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010), no entanto, nenhum aplicou antígenos purificados com base em carboidratos. Frações Con-A não mostraram alta sensibilidade para a detecção de IgA em pacientes com estrongiloidíase. Pode-se apresentar como hipótese o fato da purificação expor diferentes epítomos responsáveis pela reação cruzada com indivíduos que poderiam ter tido contato prévio com o parasito. O contato constante com componentes antigênicos de *S. stercoralis* em área hiperendêmica, onde o estudo foi conduzido, razoavelmente pode ter ocasionado uma resposta mediada por anticorpos IgA.

Atkins et al. (1999) demonstraram que a IgA reagiu com mais componentes antigênicos do que outros isotipos testados e que a reatividade com bandas imunodominantes no *immunoblot* foi significativamente aumentado entre os copronegativos. Diferenças na porcentagem de pacientes infectados por *S. stercoralis* com IgA *Strongyloides*-específica detectável em relação a outros estudos provavelmente deve-se a heterogeneidade dos pacientes amostrados (ROSSI et al., 1993). Tais considerações apontam para a necessidade de entender-se a IgA específica na estrongiloidíase humana. São necessários estudos prospectivos complementares para integrarem dados da resposta imune de IgA anti-*S. stercoralis*. Isso é importante para a definição da importância de IgA, combinada com outros marcadores, no diagnóstico diferencial da estrongiloidíase, sobretudo em indivíduos de áreas endêmicas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a fração antigênica, obtida de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, sem afinidade com

concanavalina-A (FNL Con-A) é fonte importante de componentes antigênicos para detectar IgG em pacientes com estrongiloidíase quando testados por ELISA. Os resultados da FNL Con-A gera implicações para o posterior aprofundamento dos trabalhos com a mesma. Epítomos imunodominantes selecionados na fração seriam importante em estudos para explicações dos mecanismos envolvidos na produção de anticorpos IgG contra antígenos glicosilados.

Um fator que difere as glicoproteínas de patógenos das humanas é exatamente o resíduo terminal de manose que tem afinidade à Con-A. As glicoproteínas humanas nunca terminam em manose. Por isto, a manose é considerada um padrão molecular associado à patógenos (PAMP; *pathogen-associated molecular pattern*) reconhecido por receptores da imunidade inata. Portanto, ativa a resposta inata conduzindo a resposta adaptativa dependente de linfócitos T. Por outro lado, antígenos com carboidratos ativam resposta imune de linfócitos B de forma T independente com produção de IgM (HERBERT et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Faz-se notar que a resposta anti-carboidrato de IgG aparentemente decaem no sentido do fracionamento, isto é ES, FNL e FL Con-A, porque são anticorpos de resposta imune adaptativa. Para avaliar esses aspectos, será necessário explorar os mecanismos de resposta imune aos componentes de FNL Con-A na apresentação antigênica e ativação de células T e posterior uso na detecção de outras imunoglobulinas, como IgE e IgM, em pacientes com estrongiloidíase.

5.2 Avidéz de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*

O espectro clínico da infecção nas fases aguda ou crônica por *S. stercoralis* varia de quadros subclínicos a casos com sinais cutâneos, sintomas pulmonares e manifestações gastrointestinais. A ocorrência de autoinfecção nos humanos por helmintos é conhecida somente em *Capillaria philippinensis* Chitwood, Valesquez & Salazar, 1968 e *S. stercoralis* (EUA, 2009). Em relação a *S. stercoralis*, o fenômeno da autoinfecção explica a infecção persistente em imigrantes e viajantes, que moram distantes de área endêmica há muitos anos, e as síndromes de disseminação e hiperinfecção nos pacientes imunocomprometidos (GROVE, 1996; KEISER; NUTMAN, 2004; MARCOS et al., 2008; VAIYAVATJAMAI et al., 2008; BIGGS et al., 2009). Do mesmo modo, pessoas imunocompetentes, quando cronicamente infectadas por *S. stercoralis*, podem controlar por décadas a carga de parasitária a níveis basais ou mantêm a infecção ativa por autoinfecção ou reinfecção, se de áreas endêmicas (GENTA, 1992, 1996; LIU; WELLER, 1993; FARDET et al., 2007). Não há outra espécie de nematódeo parasita de humanos que tem associado manifestações e síndromes clínicas tão amplas como *S. stercoralis*.

No entanto, níveis de anticorpos ainda não diferenciam totalmente entre infecção ativa de resultados sorológicos falsos positivos. Além disso, testes imunodiagnósticos não são capazes de distinguir casos com eliminação de larvas detectáveis em exames coproparasitológicos dos casos com exames de várias amostras fecais negativas para *S. stercoralis*, mas com resultados positivos em ensaios sorológicos. Por essa razão, não foi estabelecida uma estratégia de triagem ideal (SUDARSHI et al., 2003; HIRA et al., 2004). Como exemplo cita-se o problema de por em dúvida casos em que não é possível o encontro de larvas nas vezes, mesmo com investigação intensiva, mas o diagnóstico é clinicamente suspeito.

Testes sorológicos de avides são conhecidos por discriminarem entre infecções agudas e crônicas, principalmente, para parasitos protozoários. Para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii* os testes avides são bem estabelecidos em diversas situações de diagnóstico peculiares ao parasito (JENUN et al., 1997; BÉLA et al., 2008). Na toxoplasmose, os autores sugerem que a avides de anticorpos IgG é um marcador válido para a infecção recente, sendo que a baixa avides de IgG nem sempre identifica uma infecção recentemente adquirida, mas a alta avides pode excluir infecções primárias.

A associação do exame de fezes negativo com esses dados leva a suposição de que os altos índices de avides observados no grupo copronegativo para *S. stercoralis* indicariam a exclusão da infecção recente. Como resultado dos índices de avides (IA >75%) revelados no grupo copronegativo com sorologia positiva (G4), suspeita-se que os indivíduos tiveram contato prévio com o parasito seguido pela erradicação natural ou tratamento anti-helmíntico. Pode-se discutir também que a exposição antigênica constante na área hiperendêmica de estudo acarretou na maior maturação da afinidade funcional de IgG.

A medida da avides provê dados epidemiológicos robustos quando usada para analisar grupos, mas a interpretação dos resultados de avides, para um paciente é menos exata devido à variação individual (BJÖRKMAN et al., 2005). Outro ponto determinante de ensaios fundamentados na avides é a quantidade de anticorpo, que não pode estar em excesso (TIJSSEN, 1985; STEWARD; CHARGELEGUE, 1996; BUTLER, 2000; KAHN et al., 2009). Segundo os autores, na condição de anticorpo em excesso somente pequena parcela dos anticorpos de maior avides se ligará ao antígeno testado, o que acarreta na superestimativa dos índices de avides, perdendo-se dados relativos aos anticorpos de baixa avides. O cálculo de índices avides de triagem e médio em diferentes diluições séricas positivas para IgG reduziu as prováveis diferenças determinadas pela intensidade da resposta anticórpica e a concentração de IgG em cada amostra. O resultado obtido nas seis diluições de triagem testadas com medianas dos IA de G1

menor que G4 corroboram esse princípio. Assim, foi possível a determinação do *status* de avidéz individual.

O viés da utilização do cálculo do IA à primeira diluição foi minimizado com a observação de melhor performance diagnóstica do ponto IA de triagem na segunda diluição (1:160). Apesar de ser um dos mais utilizados pela praticidade laboratorial, o IA ao primeiro ponto tem a desvantagem de depender da quantidade de IgG específica na amostra que determina variabilidade de resultados (JENUM et al., 1997). Concentrações menores de anticorpos diminuem a formação de agregados, especialmente na utilização de reagentes complexos, como anticorpos séricos e preparados antigênicos totais (STEWART; CHARGELEGUE, 1996; BUTLER; 2000).

A determinação de antígenos por *immunoblot* reconhecidos por anticorpos de alta e baixa avidéz, na presença de infecção parasitária em humanos, foi sugerida para toxoplasmose (MARCOLINO et al., 2000) e para esquistossomose (TAWFEEK; HAMEED; EL-HOSEINY, 2004). Resultados comparados entre ELISA e *immunoblot* sugerem interpretações complementares nos casos testados. Nesses casos o critério final da avidéz das amostras no *immunoblot* acompanha o perfil delineado para separação dos grupos por ELISA (G1 IA < 75% e G4 IA > 75%). Alguns indivíduos não revelaram por ELISA anticorpos com alta avidéz durante a fase crônica sem eliminação de larvas nas fezes (G4), porém mantiveram bandas com marcação de anticorpos de alta avidéz. Inversamente, pacientes de G1 com alta avidéz no ELISA tiveram alto decréscimo na intensidade em pelo menos duas bandas – baixa avidéz. Tais resultados podem ser explicados pelos princípios diferentes de cada técnica. O *immunoblot* avidéz utiliza somente um ponto de diluição do soro e tem princípio qualitativo; desse modo, os resultados do *blot* devem ser interpretados com cautela (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2005).

Fora essas limitações, o *immunoblot* avidéz assinala sua capacidade de tornar-se uma ferramenta complementar para identificação dos principais antígenos

responsáveis pela maturação da afinidade. Entre os antígenos larvais de *S. venezuelensis*, nenhum marcador diferencial de G1 e G4 foi encontrado. Todavia, antígenos na faixa de 120-160 kDa são candidatos para a padronização de outro ELISA a videz. Apontam serem os principais envolvidos na maturação da afinidade o que poderia reduzir variações individuais relacionadas a antígenos secundários. Investigações futuras são necessárias para examinar um número maior de amostras. Dessa forma, o *immunoblot* a videz servirá como ferramenta complementar pra identificar antígenos responsáveis pela maturação da afinidade, como já visto para outras parasitoses (NEDELJKOVIC; JOVANOVIC; OKER-BLOM, 2001; AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2005).

Esses achados refletem que ensaios de a videz de IgG tem um problema inerente. A maturação da resposta de IgG após uma infecção primária, como determinado pela capacidade de ligação (IA), varia consideravelmente entre os indivíduos, como descrito para toxoplasmose (BÈLA et al., 2008) e neurocisticercose (MANHANI et al., 2009). Assim, para cada infecção analisada é importante avaliar as particularidades imunológicas estudadas. A explicação pode estar nas diferenças entre gravidade da infecção, grau da excreção larval, interações entre parasito e hospedeiro e fatores ambientais (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999), flutuações na a videz (AGUADO-MARTÍNEZ et al., 2005) e maturação de a videz de diferentes subclasses de IgG (STERLA; SATO; NIETO, 1999; VIANA; RABELLO; KATZ, 2001).

É conclusivo que a estrogiloidíase depara com dificuldade notável para ser diagnosticada parasitologicamente, o que explica, parcialmente, o longo período de não suspeitar da infecção em alguns indivíduos (SUDARSHI et al., 2003). Índices indiretos de infecção, como contagem de eosinófilos sanguíneos, são muitas vezes moderados e não específicos; ou seja, são úteis no grupo como um todo, mas sem valor na análise individual (LIU; WELLER, 1993; GROVE et al., 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; LOUFTY et al., 2002). A a videz de IgG avaliada por duas técnicas pode ser um indicador indireto com valor diagnóstico global, fundamentalmente em regiões endêmicas. Como um teste

único de triagem para aqueles que passarão por tratamento imunossupressor poderá revelar o diagnóstico de pacientes assintomáticos. Indivíduos com IgG de baixa avides, certamente, estariam com infecção ativa recente seguida de eliminação de larvas nas fezes; enquanto os com altos índices de avides, possivelmente, representariam casos falsos positivos ou crônicos, com infecção passadas, mas não na época da triagem .

Sackett e Haynes (2002) propuseram que quando da avaliação da aplicabilidade dos testes diagnósticos, quatro fases de questões devem ser respondias. ELISA para detectar a *estrongiloidíase*, de acordo com Speare e Durrhein (2004), encontra-se na fase II (Os pacientes com resultados positivos têm maior possibilidade de estarem infectados por *S. stercoralis* do que os pacientes com resultados negativos ou incertos?). O presente estudo, utilizando o princípio da avides, direcionou o teste ELISA para a detecção da *estrongiloidíase* humana próximo a fase III (O teste distingue pacientes com e sem a doença entre os pacientes suspeitos de terem a doença?) diferenciando a infecção ativa com liberação detectável de larvas dos casos crônicos ou falsos positivos. Um alto índice avides na ausência de sintomas ou outros parâmetros clínicos possivelmente sugerem uma infecção leve ou passada.

A *estrongiloidíase* carece de um padrão ouro para seu diagnóstico o que consiste em situação perturbadora, uma vez que a maioria dos estudos utiliza a prova coproparasitológica como padrão (JOSEPH et al., 1995). Os métodos parasitológicos diretos de procura de larvas nas fezes têm sensibilidade menor no diagnóstico da *estrongiloidíase* se comparados com os protocolos ELISA, no entanto a interpretação dos títulos de anticorpos no ELISA permanece não totalmente esclarecida (BIGGS et al., 2009).

O detalhamento das técnicas baseadas na avides de anticorpos, ainda não aplicadas para a *estrongiloidíase* humana, ou testes com novos preparados antigênicos, enfrentam o problema da falta de padrão referência para casos provados de *estrongiloidíase* (LOUFTY et al., 2002). Na padronização de uma abordagem original

imunodiagnóstica geralmente são utilizados casos de infecções comprovadas pelo encontro de larvas de *Strongyloides* nas fezes para determinar os índices de performance. A alta sensibilidade dos ensaios ELISA sugere que a infecção por *S. stercoralis* é pouco provável em indivíduos imunocompetentes com resultado negativo no teste (ROSSI et al., 1993; LINDO et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1997, 2003; PAULA et al., 2000; LOUFTY et al., 2002; MACHADO et al., 2001, 2003; SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; VAN DOORN, 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009; BON et al., 2010; FELICIANO et al., 2010). Page et al. (2006) encontraram uma associação significativa entre sorologia positiva, ao empregarem um protocolo de ELISA indireto, e a presença de estrongiloidíase ativa. No entanto, a seleção da composição do grupo de pacientes baseada nas amostras positivas nos exames de fezes faz com que a sensibilidade do ensaio certamente não se aplique a todos os pacientes com suspeita de estrongiloidíase.

Baseado nos dados apresentados, a avidéz de IgG tem a habilidade de detectar a infecção ativa por *S. stercoralis* com eliminação de larvas nas fezes. Isso deve ser útil no diagnóstico rápido da doença, por triagem com única amostra de soro, bem como em estudos soroepidemiológicos nos casos em que os contatos prévios poderiam confundir a interpretação dos ensaios de IgG no diagnóstico sorológico.

6. CONCLUSÃO

A fração não ligante de concanavalina-A obtida de extrato salino de larvas filarioides de *Strongyloides venezuelensis* demonstrou ser fonte de antígenos específicos para detecção de IgG no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana.

O ensaio baseado no princípio da avidéz de anticorpos IgG é potencialmente aplicável como ferramenta complementar em exames de triagem e estudos soropidemiológicos no diagnóstico diferencial: (1) da infecção ativa por *S. stercoralis*, com eliminação de larvas, (2) dos casos suspeitos ou falso positivos.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2003. 402 p.
- ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 1-2, 1998.
- ABOU-BASHA, L. M.; SHEHAB, A. Y.; OSMAN, M. M.; FARAG, H. F. Specific IgG avidity in acute and chronic human fascioliasis. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 6, p. 919-925, 2000.
- AEED, P. A.; GENG, J. G.; ASA, D.; RAYCROFT, L.; MA, L.; ELHAMMER, A. P. Characterization of the O-linked oligosaccharide structures on P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). **Glycoconjugate Journal**, v. 15, p. 975-985, 1998.
- AGRAWAL, V.; AGARWAL, T.; GHOSHAL, U. C. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 242-246, 2009.
- AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ARNAIZ-SECO, I.; INNES, E.; ORTEGA-MORA, L. M. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 442-450, 2005.
- ALARCÓN DE NOYA, B.; COLMENARES, C.; LANZ, H.; CARACCILO, M. A.; LOSADA, S.; NOYA, O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 106-112, 2000.
- ALMEIDA, I. C.; KRAUTZ, G. M.; KRETTLI, A. U.; TRAVASSOS, L. R. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 7, p. 307-316, 1993.
- ALVES, R.; SILVA, D. A. O.; FERNANDES, J.F.C.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; BERNARDES, C. T. V.; MOREIRA, P. S. F.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; SUNG, S. S. J.; TAKETOMI, E. A. Humoral and cellular immune responses to *Blomia tropicalis* and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 773-781, 2008.

¹ Segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) descritas em SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. **Guia para normalização de trabalhos técnico-científicos**: projetos de pesquisa, monografias, dissertações, teses. Uberlândia: EDUFU, 2002. 159p.

- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford : C.A.B International, 2000. 650 p.
- ANDRADE-NETO, J. L.; ASSEF, M. C. V. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 1373-1378, 1996.
- ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; STADECKER-JR., M. J.; GAUSE, W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 975-987, 2007.
- 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.
- ATKINS, N. S.; LINDO, F. J.; CONWAY, D. J. BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D., BUNDY, D. A. P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 609-613, 1997.
- ATLURI, S. R. V.; SINGHI, P.; KHANDELWAL, N.; MALLA, N. Neurocysticercosis immunodiagnosis using *Taenia solium* cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children. **Acta Tropica**, v. 110, p. 22-27, 2009.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BARBIERI, M.; FERNÁNDEZ, V.; GONZÁLEZ, G.; LUACES, V. M.; NIETO, A. Diagnosis evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hidatidosis. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 51-61, 1998.
- BASSI, G. E.; ISHIKI, D. K.; FERREIRA, A. W.; CAMARGO, M. E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano - considerações sobre o limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 27, p. 49-52, 1991.
- BÉLA, S. R.; SILVA, D. A. O.; JUNIOR, J.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; CARVALHO, F.; OLIVEIRA, T. C.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 245-254, 2008.
- BENER, A.; MICALLEF, R.; AFIFI, M.; DERBALA, M. AL-MULLA, H. M.; USMANI, M. A. Association between type 2 diabetes mellitus and *Helicobacter pylori* infection. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 225-229, 2007.

- BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. Carbohydrates can be attached to proteins to form glycoproteins. In: _____. **Biochemistry**. 5 ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2002. p. 306-317.
- BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. P. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, p. 1521-1532, 2006.
- BIGGS, B.; CARUANA, S.; MIHRSHAHI, S.; JOLLEY, D.; LEYDON, J.; CHEA, L.; NUON, S. Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 788-791, 2009.
- BJÖRKMAN, C.; GONDIM, L. F.; NÄSLUND, K.; TREES, A. J.; MCALLISTER, M. M. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 195-200, 2005.
- BON, B.; HOUZE, S.; TALABANI, H.; MAGNE, D.; BELKADI, G.; DEVELOUX, M.; SENGHOR, Y.; CHANDENIER, J.; ANCELLE, T.; HENNEQUIN, C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1716-1719, 2010.
- BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L.; SEET, R. C.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. **American Journal of Medicine**, v. 120, p. 545-548, 2007.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448 p.
- BUTLER, J. E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunossays. **Methods**, v. 22, p. 4-23, 2000.
- CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 213-218, 1991.
- CAMPOS, D. M. B.; OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CAMPOS, L. L.; ROSA, Z. S.; SOUZA, O. C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (DARLING, 1911) no diagnóstico da estrongiloidíase humana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 17, p. 17-23, 1988.

CANDOLFI, E.; PASTOR, R.; HUBER, R.; FILISETTI, D.; VILLARD, O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 83-88, 2007.

CELEDON, J. C.; MATHUR-WAGH, U.; FOX, J.; GARCIA, R.; WIEST, P. M. Systemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and reviews of the literature. **Medicine**, v.73, p. 256-263, 1994.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: EDUFU, 1997, 55 p.

CHIUSO-MINICUCCI, F.; MARRA, N. M.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W; AMARANTE, M. R. V.; AMARANTE, A. F. T.; SARTORI, A. Recovery from *Strongyloides venezuelensis* infection in Lewis rats is associated with a strong Th2 response. **Parasite Immunology**, v. 32, p. 74-78, 2010.

CONWAY D.J.; ATKINS, N. S.; LILLYWHITE, J. E.; BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D.; LINDO, J. F.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. Immuno-diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect-ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 173-176, 1993a.

CONWAY D.J.; BAILEY, J. W.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 784-787, 1993b.

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-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. p. 275-284.

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; PIRES, M. R. F. G.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome 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.

COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with samples collected on filter paper, in Abadia dos Dourados Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329-331, 1998.

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

CUMMINGS, R. D.; KORNFIELD, S. Fractionation of asparagine linked oligosaccharides by serial lectin affinity chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 11235-11240, 1982.

DEVI, U.; BORKAKOTY, B.; MAHANTA, J. Strongyloidiasis in Assam, India: a community-based study. **Tropical Parasitology**, v. 1, p. 30-32, 2011.

DURHAM, M.; REGNIER, F. E. Targeted glycoproteomics: serial lectin affinity chromatography in the selection of O-glycosylation sites on proteins from the human blood proteome. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, p.165-173, 2006.

DZIEMIAN, E.; ARNOWSKA, H.; KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA, M.; MACHNICKA, B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 187-190, 2008.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REECKE, G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. W.; WANG, J. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 69, p. 2580-2584, 1972.

EL ZAYYAT, E. A.; KHALIFA, K. E.; EL GINDY, I. M.; AWAD, A.; AZAB, M. E. Evaluation of specific immunoglobulin G avidity enzyme linked immunosorbent assay (IgG avidity ELISA) in diagnosis of early and chronic *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 28, p. 739-752, 1998.

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

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

EUA. Centers for Disease Control & Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. **Strongyloidiasis**. 2009. Disponível em: < <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 11 jan. 2011.

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.

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.

FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T. M.; ESCHENAZI, P. D.; SCHILTER, H. C.; SOUSA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 139-149, 2008.

FERREIRA, C. M.; PEREIRA, A. T. M.; SOUZA, R. S.; CASSALI, G. D.; SOUZA, D. G.; LEMOS, V. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 813-820, 2007.

FERREIRA, M. S. Infecções no hospedeiro imunocomprometido. In: COURA, J. R. (Ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, A. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; ARAÚJO, F. F. N. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.

FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C. S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrongiloidíase. **A Folha Médica**, v. 101, p. 229-235, 1990.

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

GAM, A. A.; NEVA, F. A.; KROTOSKI, W. A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 157-161, 1987.

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 345-355, 1992.

GENTA, R. M. The immune regulation of intestinal helminthiases. In: PARADISE, L. J.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. **Enteric Infections and Immunity**. Nova York: Springer, 1996. p. 239-252.

GENTA, R. M.; FREI, D. F.; LINKE, M. J. Demonstration and partial characterization of parasite-specific immunoglobulin A responses in human strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1505-1510. 1987

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELL, A.; FAVORETO-JÚNIOR, S.; FERREIRA, M. S. GORDON, I. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 135-141, 2008.

GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, F.; CARDOSO, C.; BELETTI, M.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 319-328, 2009.

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.

GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v.185, p.123-132, 1995.

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

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.

GROVE, D. I.; NORTHERN, C. Infection and immunity in dogs infected with a human strain of *Strongyloides stercoralis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 833-838, 1982.

GUTIERREZ, J.; MAROTO, C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious diseases? A review. **Microbios**, v. 87, p. 113-112, 1996.

HANLEY, J. A.; MCNEIL, B. J. Maximum attainable discrimination and the utilization of radiologic examinations. **Journal of Chronic Diseases**, v. 35, p. 601-611, 1982.

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

HERBERT, D. R.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Parasite Immunology**, v. 24, p. 95-101, 2002.

HERMANSON, G. T.; MATTSON, G. R.; KROHN, R. I. Preparation and use of immunoglobulin-binding affinity supports on emphaze beads. **Journal of Chromatography A**, v. 691, p.113-122, 1995.

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.

HONG, Y.; KIM, J.; RHEEM, I.; KIM, J.; KIM, S.; CHAI, J.; GUK, S.; LEE, S.; SEO, M. Observation of the free-living adults of *Strongyloides stercoralis* from a human stool in Korea. **Infection and Chemotherapy**, v. 41, p. 105-108, 2009.

HÜBNER, J.; UHLÍKOVÁ, M.; LEISSOVÁ, M. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. **Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti J.E. Purkyne**, v. 50, p. 67-70, 2001.

JAESCHKE, R.; GUYATT, G. H.; SACKET, D. L. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, p. 703-707, 1994.

JENUM, P. A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A. G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 1972-1977, 1997.

JOSEPH, L.; GYORKOS, T. W.; COUPAL, L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. **American Journal of Epidemiology**, v. 141, p. 263-272, 2005.

KAHN, M. N.; DASS, P. D.; LEETE, J. H.; SHUMAN R. F.; GUNSIOR, M.; SADHU, C. Development of ligand-binding assays for drug development support. In: KHAN, M. N.; FINDLAY, J. W. **Ligand-binding Assays: development, validation, and implementation in the drug development arena**. 1. ed. Indianapolis: John Wiley and Sons, 2009. p. 39-58.

KAKATI, B.; DANG, S.; HEIF, M.; CARADINE, K.; MCKNIGHT, W.; ADULI, F. Strongyloides duodenitis: case report and review of literature. **Journal of the National Medical Association**, v. 103, p. 60-63, 2011.

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

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.

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

KRAMME, S.; NISSEN, N.; SOBLIK, H.; ERTTMANN, K.; TANNICH, E.; FLEISCHER, B.; PANNING, M.; BRATTIG, N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* spp. **Journal of Medical Microbiology**, 2010. DOI 10.1099/jmm.0.025338-0.

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

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

LINDO, J. F.; ATKINS, N. S.; LEE, M. G.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. Parasite-specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 702-703, 1996.

LINDO, J. F.; CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 175-179, 1994.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.

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

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

LOUTFY, M. R.; WILSON, M.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 749-752, 2002.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-155, 1919.

MACHADO, G. A. **Análise de frações antigênicas da forma metacestódea de *Taenia solium*, obtidas pelo Triton X-114 e por cromatografia de afinidade, no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana**. 2008. 110f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

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.

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.

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.

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.

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

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

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SILVA, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COSTA-CRUZ, J. M.; FACCIOLI, L. H. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 72-79, 2011.

MARCILLA, A.; SOTILLO, J.; PÉREZ-GARCIA, A.; IGUAL-ADELL, R.; VALERO, M. L.; SÁNCHEZ-PINO, M. M.; BERNAL, D.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; TRELIS, M.; TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. **Parasitology**, v. 14, p. 1-7, 2010.

MAIZELS, R. M.; BUNDY, D. A. P.; SELKIRK, M. E.; SMITH, D. F.; ANDERSON, R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v. 365, p. 797-805, 1993.

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

MANGALI, A.; CHAICUMPA, W.; NONTASUT, P.; CHANTAVANIJ, P.; TAPCHASRI, P.; VIRAVAN, C. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human strongyloidiasis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 22, p. 88-92, 1991.

MANNHANI, M. N.; RIBEIRO, V. S.; SILVA, D. A. O.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG avidity in active and inactive human neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, p. 211-213, 2009.

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

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

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F.; FRANÇA, T. G.; ISHIKAWA, L. L.; AMARANTE, A. F.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 57-61, 2010.

MARTINEZ, A. M. B.; SOUZA, W. A freeze-fracture and deep-etch study of the cuticle and hypodermis of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). **International Journal of Parasitology**, v. 23, p. 289-297, 1997.

MARTINEZ, A. M. B.; SOUZA, W. A quick-frozen, freeze-fracture, and deep-etch study of the cuticle of adult forms of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda). **Parasitology**, v. 111, p. 523-529, 1995.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 11, p. 7-31, 2003.

MARUYAMA, H.; EL-MALKY, M.; KUMAGI, T.; OHTA, N. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult worms in the host intestinal mucosa. **Parasitology**, v. 126, p. 165-171, 2003.

MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; EL-MALKY, M.; OKAMURA, S.; AOKI, M.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NAWA, Y.; SHIMADA, S.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: longitudinal distribution of adult worms in the host intestine is influenced by mucosal sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 179-185, 2002.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 10-15, 1997.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 16-20, 1998.

- 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. 3749-3759, 2000.
- MATSUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, p. 69-72, 2005.
- MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do 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.
- MONTES, M.; SANCHEZ, C.; VERDONCK, K.; LAKE, J. E.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G.; TERASHIMA, A.; NOLAN, T.; LEWIS, D. E.; GOTUZZO, E.; WHITE JUNIOR, A. C. Regulatory T Cell Expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, e456, 2009.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 64, p. 507-624, 1948.
- MOSTAFA, N. E.; AWAD, A.; SHALABY, M. Low avidity IgG antibodies in diagnosis of recent human schistosomiasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 32, p. 979-985, 2002.
- MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; FERREIRA JÚNIOR, 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.
- NAISMITH, J. H.; FIELD, R. A. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 972-976, 1996.
- NEDELJKOVIC, J.; JOVANOVIĆ, T.; OKER-BLOM, C. Maturation of IgG avidity to individual rubella virus structural proteins. **Journal of Clinical Virology**, v. 22, p. 47-54, 2001.
- 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. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006.
- NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M. M. The mutual influence of Nematode infection and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 90, p.14-28, 2006.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

NORTHERN, C.; GROVE, D. I. Antigenic analysis of *Strongyloides ratti* infective larvae and adult worms. **Immunology & Cell Biology**, v. 65, p. 231-239, 1987.

NORTHERN, C.; GROVE, D. I.; WARTON, A.; LOVEGROVE, F. T. Surface labelling of *Strongyloides ratti*: stage-specificity and cross-reactivity with *S. stercoralis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 75, p. 487-92, 1989.

NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; COSTA-CRUZ, J. M. Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 259-264, 2010.

OCHS, H. D.; WEDGWOOD, R. J. IgG subclass deficiencies. **Annual Review of Medicine**, v. 38, p. 325-340, 1987.

OLIVEIRA, H. B. **Avaliação de frações antigênicas da forma metacestódea de *Taenia saginata* no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana**. 2008. 111f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

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.

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.

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

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 97, 1991.

OVINGTON, K. S.; BEHM, C. A. The enigmatic eosinophil: Investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 93-104, 1997.

PAGE, W. A.; DEMPSEY, K.; MCCARTHY, J. S. Utility of serological follow-up of chronic strongyloidiasis after anthelmintic chemotherapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 1056-1062, 2006.

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.
- PAULA, F. M.; CASTRO-BORGES, W.; PEREIRA-JÚNIOR, O. S.; GOMES, M. S.; UETA, M. T.; RODRIGUES, V. The ubiquitin–proteasome system in Strongyloidea. Biochemical evidence for developmentally regulated proteolysis in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 567-576, 2009.
- 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.
- RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 73-81, 2002.
- REDHU, N. S.; DEY, A.; BALOONI, V.; SINGH, S. Use of immunoglobulin G avidity to determine the course of disease in visceral and post-kala-azar dermal leishmaniasis patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 969-971, 2006.
- REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrrongiloidíase. In: _____. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 581-590.
- 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.
- RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R. de; 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.
- RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CAMPOS, D. M. B.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1209-1214, 2007.
- RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, A. L. R.; CARDOSO, C. R.; ALVES, R.; GONÇALVES, F. A.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v. 128, p. e432-e441.

RODRIGUEZ-CANUL, R.; ALLAN, J. C.; FLETES, C.; SUTISNA, I. P.; KAPTI, I. N.; CRAIG, P. S. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 579-582, 1997.

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

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

RYCHLICKI W. Use of specific immunoglobulin G antibody avidity in the differential diagnosis of active and chronic *Toxocara canis* infections. **Wiadomości Parazytologiczne**, v. 50, p. 229-236, 2004.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v. 324, p. 539-541, 2002.

SACKETT, D. I.; HAYNES, R. B.; GUYATT, O. H.; TUGNELL, P. **Clinical epidemiology, a basic science for clinical medicine**. 2. ed. Boston: Little Brown, 1991.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 35-41, 1995.

SCHER, M. G.; RESNECK, W. G.; BLOCH, R. Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. **Analytical Biochemistry**, v. 177, p. 168-171, 1989.

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

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.

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

SOPELETE, M. C. Métodos de análise em estudos sobre diagnóstico. In: 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**. 1. ed. Uberlândia: EDUFU. 2005. p. 215-238.

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, 1989. p. 11-84.

SPEARE, R.; DURRHEIN, D. *Strongyloides* serology-useful for diagnosis and management of strongyloidiasis in rural Indigenous populations, but important gaps in knowledge remain. **Rural and Remote Health**, v. 4, p. 1-9, 2004.

STEFANIAK, J.; KACPRZAK, E.; PAUL, M. Clinical value of *Echinococcus granulosus*-specific immunoglobulin G antibody avidity in liver cystic echinococcosis. **Wiadomości Parazytologiczne**, v. 47, p. 477-482, 2001.

STEINMANN, P.; ZHOU, X.; DU, Z.; JIANG, J.; WANG, L.; WANG, X.; LI, L.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 1-6, 2007.

STERLA, S.; SATO, H.; NIETO, A. *Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity antipeptide IgG4 antibodies. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 27-34, 1999.

STEWART, M. W.; CHARGELEGUE, D. Overview: measurement and biological significance of antibody affinity and reactivity. In: HERZENBERG, L. A.; WEIR, D. M.; BLACKWELL, C. **Weir's Handbook of Experimental Immunology: Cell Surface and messenger molecules of the immune system**. 5. ed., Cambridge: Massachusetts Blackwell Science, 1996. p. 38. 1-38.35.

SUDARSHI, S.; STÜMPFLE, R.; ARMSTRONG, M.; ELLMAN, T.; PARTON, S.; KRISHNAN, P.; CHIODINI, P. L.; WHITTY, C. J. M. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travellers compared with immigrants in a non-endemic country. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 728-732, 2003.

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

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, p. 227-237, 1936.

TAWFEEK, G. M.; HAMEED, D. M.; EL-HOSEINY, L. M. Avidity of immunoglobulin G antibody response to the different antigenic fractions of soluble *Schistosoma mansoni* adult worm antigen preparation (SWAP) using avidity immunoblotting assay. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 34, p. 543-558, 2004.

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

TIJSEN, P. Kinetics and nature of antibody-antigen interactions. In: _____. **Practice and theory of enzyme immunoassays**. 1. ed., Amsterdã: Elsevier, 1985. p. 123-145.

TOBATA-KUDO, H.; KUDO, H.; TADA, I. *Strongyloides ratti*: chemokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae *in vitro*. **Parasitology International**, v. 54, p. 147-152, 2005a.

TOBATA-KUDO, H.; KUDO, H.; TADA, I. *Strongyloides ratti*: thermokinesis of glycolytic enzyme- and lectin-treated third-stage infective larvae *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 95, p. 314-318, 2005b.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4352, 1979.

TSUJI, N.; KAWAZU, S.; NAKAMURA, Y.; FUJISAKI, K. Protein analysis of *Strongyloides venezuelensis* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.55, p.881-883, 1993.

TSUJI, N.; OHTA, M.; FUJISAKI, K. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology Research**, v.83, p.99-102, 1997.

TURNER, J. D.; FAULKNER, H.; KAMGNO, J.; CORMONT, F.; Van SNICK, J.; ELSE, K. J.; GRENCIS, R. K.; BEHNKE, J. M.; BOUSSINESQ, M.; BRADLEY, J. E. Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 1768-1775, 2003.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.

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

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., KOELEWYN, 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.

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.

VIANA, L. G.; RABELLO, A.; KATZ, N. Antibody subclass profile and avidity during acute and chronic human *Schistosoma mansoni* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 550-556, 2001.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. 2007. In: HODGKIN, J.; ANDERSON, P. **Wormbook**: the *C. elegans* Research Community. Disponível em: <<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

WEINSTOCK, J. V.; SUMMERS, R. W.; ELLIOTT, D. E. Role of helminths in regulating mucosal inflammation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 27, p. 249-271, 2005.

WEST, I.; GOLDRING, O. Lectin affinity chromatography. In: CUTLER, E. **Methods in Molecular Biology**. v. 244, Totowa: Humana Press, 2003. p. 159-166.

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

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

YODEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p.32-35, 1950.