



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

Nágilla Daliane Feliciano

Avaliação de frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

**Uberlândia – MG
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

Nágilla Daliane Feliciano

Avaliação de frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Prof.^ª Dra. Julia Maria Costa Cruz
Orientadora

**Uberlândia – MG
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- F314a Feliciano, Nágilla Daliane, 1981-
Avaliação de frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana [manuscrito] / Nágilla Daliane Feliciano. - 2010.
86 f. : il.
- Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Estrongiloidíase - Diagnóstico - Teses. 2. Imunodiagnóstico - Teses. 2. Antígenos - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616.995.132.2

“Uma pequenina mudança hoje acarreta-nos um amanhã profundamente diferente. São grandes as recompensas para aqueles que optam pelos caminhos duros e difíceis, mas recompensas acham-se ocultas pelos anos. Toda escolha é feita inteiramente às cegas, e o mundo não nos dá garantia alguma... O bom caráter advém de seguirmos nosso supremo senso de retidão, de confiarmos nos ideais sem sequer estarmos certos de que darão certo.”

(Richard Back)

“O segredo é sempre estar de braços estendidos em vez de cruzados.”

Dedico este trabalho em especial:

*Aos meus pais, Adão e Cleides;
Que são o meu exemplo de vida e a quem devo tudo o que hoje sou,
E com orgulho lhes agradeço imensamente;
Por todas as vezes que estiveram do meu lado;
Por toda a verdade em que me fizeram crer;
Por toda a alegria que trazem à minha vida;
Por todas as vezes em que eu estava errada e me tornaram certa;
Por cada sonho meu que transformaram em realidade;
Por todo o amor que neles encontrei.*

*Serei eternamente grata;
Vocês são quem me conhecem por dentro por inteiro;
Vocês são a minha força quando eu me sinto fraca;
Vocês são a minha voz quando eu não posso falar;
Vocês são meus olhos quando eu não posso ver;
Vocês vêem o que tem de melhor em mim;
Me erguem quando eu não posso alcançar;
Vocês me dão fé porque vocês acreditam em mim.*

*Sou tudo o que sou
Porque vocês me deram todo o seu amor, carinho e educação;
Vocês me dão asas e me deixam voar;
Seguram a minha mão e assim eu posso tocar o céu;
Quando perco minha fé, vocês a trazem de volta
E dizem que nenhuma estrela é inalcançável;
Quando vocês estão do meu lado eu me sinto maior!
Vocês são a minha inspiração....*

*A Deus Pai, sempre presente comigo, e agradeço pelas mãos estendidas
nos momentos difíceis, dando-me força e sabedoria para diferenciar
o que é bom do que é ruim, obrigado por me dar coragem
para estender as mãos em vez de cruzar os braços.*

*Aos meus queridos amigos de graduação, em especial Bruno Caetano Trindade,
Taciana Rachid e Daniela "Tormento", que mesmo apesar da distância estiveram
sempre presentes em minha vida e sempre torcendo
pelo meu sucesso. Minha vida não teria
a mesma alegria se vocês
não fizessem parte dela .*

*Aos meus irmãos Pedro Augusto Feliciano e Geísa Marielle Feliciano,
e à toda minha família, dos mais distantes e ausentes aos mais
próximos agradeço pelo incentivo e entusiasmo
a cada fase dessa etapa.*

Meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz, que acreditou em meu potencial e que não mediu esforços em dedicar a mim suas lições de saber, sua experiência e competência profissional. Agradeço pela amizade, paciência e boa vontade em ter compartilhado comigo seus conhecimentos partes essenciais para a minha formação e realização deste trabalho.

Manifesto meu reconhecimento e estima.

A uma pessoa muito especial, que infelizmente não faz mais parte da minha vida mas que foi peça chave para que eu buscasse meu enriquecimento e crescimento pessoal. Eu te agradeço pois mesmo estando ausente por todos esses anos, você ainda me faz crescer como pessoa.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Parasitologia pela agradável convivência e pelos momentos de descontração durante o período de trabalho. Em especial agradeço aos colegas e amigos Marianna Nascimento Manhani, Vanessa da Silva Ribeiro e Henrique Tomaz Gonzaga que não mediram esforços em me ajudar na etapa final de desenvolvimento do meu trabalho;

Às funcionárias Maria do Rosário F. Gonçalves Pires, Maria das Graças Marçal, Elaine Silva Marques Faria, Scheila Pedrosa Franco Barbosa e Rosângela Terezinha da Silva Moreira agradeço pela amizade e auxílio em todos os momentos;

Aos colegas e amigos Guilherme Ramos Oliveira e Freitas, Loyane Bertagnolli Coutinho, Rosiane Nascimento Alves e Daiane Silva Resende, pessoas muito especiais a quem tenho muito estima e admiração, agradeço pela companhia nos momentos de dificuldade compartilhados e nos momentos de distração depois de um dia duro de trabalho. Vocês são presentes de Deus;

À colega e amiga de pós-graduação Juliana Silva Miranda do Laboratório de Imunologia que não mediu esforços em auxiliar em meus experimentos. Aos demais amigos do Laboratório de Imunologia agradeço pela amizade e pelas sugestões que enriqueceram meu trabalho;

Aos colegas de pós-graduação engraçados e aos sérios, aos que algumas vezes me jogaram no chão e aqueles que sempre me levantaram, a todos que de alguma forma fizeram parte de minha vida, agradeço pela amizade e pelos momentos enriquecedores vividos no dia a dia;

Aos mestres do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, que compartilharam comigo seus conhecimentos e sua própria existência, e que, além disso, me deram apoio nas horas mais difíceis de minha jornada, o meu sincero agradecimento;

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este projeto e ao CNPq pelo apoio financeiro;

Há muito mais a quem agradecer... Enfim agradeço a todos aqueles que, embora não nomeados, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, o meu reconhecimento e carinhoso muito obrigada !!!

LISTA DE ABREVIACÕES

°C	Graus Celsius
%	Por cento/porcentagem
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
DAB	Diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ED	Eficiência do diagnóstico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetracetic acid</i>
EA	Extrato alcalino total
EAD	Fração detergente do extrato alcalino
EAA	Fração aquosa do extrato alcalino
ES	Extrato salino total
ESA	Fração aquosa do extrato salino total
ESD	Fração detergente do extrato salino total
Fn	Falso negativo
Fp	Falso positivo
<i>g</i>	Gravidade
Grupo 1	Pacientes com estrogiloidíase
Grupo 2	Pacientes infectados por outros parasitos intestinais
Grupo 3	Indivíduos aparentemente saudáveis
IB	<i>Immunoblotting</i>
IgA	Imunoglobulina A

IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon γ
IR	Índice de reatividade
kDa	Kilodaltons
M	Molar
MHC	Major histocompatibility complex
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline – Tween</i> (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20)
PBS-TM	<i>Phosphate buffered saline – Tween - Molico</i> (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e leite desnatado – Molico)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Se	Sensibilidade
Sp	Especificidade
Ta	Temperatura ambiente
TG-ROC	<i>Two-graph receiver operating characteristic</i>
Tris	Hidroximetil
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl

Tween-20 Polioxietilensorbitano-monolaurato

TX-114 Triton X-114

UFU Universidade Federal de Uberlândia

Vn Verdadeiro negativo

Vp Verdadeiro positivo

μL Microlitros

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 – Aspectos biológicos de <i>Strongyloides stercoralis</i>	15
1.2 – Epidemiologia da estrogiloidíase humana	18
1.3 – Aspectos clínicos da estrogiloidíase humana	19
1.4 – Tratamento da estrogiloidíase humana	20
1.5 – Resposta imune do hospedeiro	20
1.6 – Diagnóstico da estrogiloidíase humana	23
1.7 – Antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da estrogiloidíase humana	26
1.8 – Fracionamento por Triton X-114	28
2 – OBJETIVOS	30
2.1 – Objetivos Gerais	30
2.2 – Objetivos Específicos	30
3 – MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 – Aspectos éticos	31
3.2 – Amostras de soro	31
3.3 – Obtenção de larvas filarióides (L3) de <i>S. venezuelensis</i>	32
3.4 – Preparação do extrato salino total de <i>S. venezuelensis</i>	33
3.5 – Preparação do extrato alcalino total de <i>S. venezuelensis</i>	33
3.6 – Fracionamento do extrato salino e alcalino total de <i>S. venezuelensis</i> através de Triton X-114 para obtenção de frações hidrofóbica e hidrofílica	34
3.7 – Perfil eletroforético das amostras antigênicas em SDS-PAGE	37
3.8 – Coloração do gel por nitrato de prata	38
3.9 – Teste ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i>	39
3.10 – <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG	42
3.11 – Normas de Biossegurança	43
3.12 – Análise Estatística	44

4 – RESULTADOS	46
4.1 – Caracterização das seis preparações antigênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	46
4.2 – ELISA para detecção de IgG anti- <i>Strongyloides</i> utilizando as seis preparações antigênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	49
4.3 – <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG anti- <i>Strongyloides</i> de <i>S. venezuelensis</i> utilizando extratos totais salino (ES) e alcalino (EA) e suas respectivas frações detergente e aquosa	61
5 – DISCUSSÃO	68
6 – CONCLUSÕES	73
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8 – ANEXO	86
Artigo Científico referente à Dissertação publicado em periódico internacional (Fator de Impacto: 2.139)	

RESUMO

A estrongiloidíase humana é uma parasitose intestinal de importância mundial, ocorre de forma assintomática em 50% dos indivíduos infectados, contudo, pode causar hiperinfecção e disseminação em pacientes imunodeprimidos. A utilização do diagnóstico preciso é de grande importância para identificação e controle desta parasitose. O emprego de antígenos fracionados tem possibilitado o desenvolvimento de testes diagnósticos mais confiáveis, uma vez que apresentam sensibilidade e especificidade superiores aos antígenos de extratos totais. O objetivo do presente estudo foi caracterizar e comparar os extratos totais salino (ES) e alcalino (EA) de *Strongyloides venezuelensis* e suas respectivas frações detergente (ESD e EAD) e aquosa (ESA e EAA) no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana. As frações antigênicas foram obtidas a partir dos extratos ES e EA por fracionamento com Triton X-114 e testadas em amostras de soro para detecção de IgG pelo teste ELISA e pelo *immunoblotting* (IB). Foram analisadas 120 amostras de soro: 40 de pacientes com estrongiloidíase (Grupo 1), 40 de pacientes com outras infecções parasitárias (Grupo 2) e 40 de indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3). Exames parasitológicos de Baermann-Moraes e Lutz foram realizados com três amostras de fezes por indivíduo para identificação ou não de parasitos intestinais. Foram calculadas a sensibilidade, especificidade e eficiência do diagnóstico de cada teste empregado para cada preparação antigênica. As sensibilidades e especificidades dos testes ELISA foram 90% e 90% (ES); 95% e 95% (ESD); 90% e 90% (ESA); 92,5% e 93,8% (EA); 87,5% e 88,8% (EAD) e 77,5% e 78,8% (EAA) respectivamente e no IB foram 95% e 92,5% (ES); 95 e 96,3% (ESD); 82,5% e 97,5% (ESA); 90% e 95% (EA); 92,5% e 95% (EAD) e 45% e 100% (EAA). No IB cada extrato demonstrou um perfil diferente de componentes antigênicos imunodominantes com variações entre as bandas de peso molecular aparente de 126, 126-90, 90, 55, 45-41, 45-33, 33 e 28 kDa. A eficiência de diagnóstico para os testes ELISA e IB para cada extrato foram: 90% e 93,3% (ES); 95% e 95,8% (ESD); 90% e 92,5% (ESA); 93,3% e 93,3% (EA); 88,3% e 94,2% (EAD) e 78,3% e 81,7% (EAA). A fração detergente obtida do extrato salino total de *S. venezuelensis* apresentou melhor eficiência de diagnóstico em ambos os testes, e é recomendada como antígeno alternativo no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana.

Palavras-chaves: Estrongiloidíase, Imunodiagnóstico, *Strongyloides venezuelensis*, Antígenos.

ABSTRACT

Evaluation of antigenic fractions of *Strongyloides venezuelensis* obtained by hydrophobicity in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis

Human strongyloidiasis is an intestinal parasitosis of worldwide importance, is asymptomatic in 50% of infected individuals, however, can cause hyperinfection and dissemination in immunosuppressed patients. The use of accurate diagnosis is very important for identification and control of this disease. The use of fractionated antigens has enabled the development of diagnostic tests more reliable, the sensitivity and specificity greater than total extracts. The aim of this study was to characterize and compare the total saline extract (ES) and alkaline (EA) of *Strongyloides venezuelensis* and their fractions detergent (ESD and EAD) and aqueous (ESA and EAA) in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. The antigenic fractions were obtained from the ES and EA extracts by fractionation with Triton X-114 and tested in serum samples to detect IgG by ELISA and by immunoblotting (IB). We analyzed 120 serum samples: 40 patients with strongyloidiasis (Group 1), 40 patients with other parasitic infections (Group 2) and 40 apparently healthy individuals (Group 3). Parasitological tests Baermann-Moraes and Lutz were performed with three samples of faeces per individual for identification or not of intestinal parasites. We calculated the sensitivity, specificity and diagnostic efficiency of each test employed for each antigenic preparation. Sensitivities and specificities of ELISA were 90% and 90% (ES), 95% and 95% (ESD), 90% and 90% (ESA), 92.5% and 93.8% (EA), 87.5% and 88.8% (EAD) and 77.5% and 78.8% (AAS) respectively and the IB were 95% and 92.5% (ES), 95 and 97.5% (ESD), 82, 5% and 97.5% (ESA), 90% and 95% (EA), 92.5% and 95% (EAD) and 45% and 100% (AAS). In IB each extract showed a different profile of immunodominant antigenic components with variations between bands of apparent molecular weight of 126, 126-90, 90, 55, 45-41, 45-33, 33 and 28 kDa. The efficiency of diagnosis for the ELISA and IB for each extract were 90% and 93.3% (ES), 95% and 96.7% (ESD), 90% and 92.5% (ESA), 93.3% and 93.3% (EA), 88.3% and 94.2% (EAD) and 78.3% and 81.7% (AAS). The detergent fraction obtained of total salt extract of *S. venezuelensis* showed better diagnostic efficiency in both tests and is recommended as an alternative antigen in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis.

Keywords: Strongyloidiasis, Immunodiagnosis, *Strongyloides venezuelensis*, Antigens.

1 – INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase é uma parasitose intestinal causada por nematódeos do gênero *Strongyloides* que acomete mamíferos, principalmente o homem, mas pode ser encontrada em outras espécies, tais como: aves, répteis e anfíbios (VINEY; LOK, 2007).

O nematódeo *Strongyloides*, pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, subclasse Rhabditia, ordem Rhabditia, família Strongylidae. O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies das quais somente duas foram descritas como infectantes para o homem, *Strongyloides stercoralis*, (Bavay, 1876) Stiles & Hassal (1902) considerada a de maior importância clínica, e a espécie *Strongyloides fuelleborni* (Grassi, 1879), causadora da estrongiloidíase humana na África e nas Filipinas (GROVE, 1996).

S. stercoralis foi identificado pela primeira vez em 1876, pelo médico francês Louis Normand na cidade de Toulon-França, ao examinar fezes diarréicas de soldados franceses que trabalhavam na Cochinchina (atual Vietnã). Esta doença foi conhecida durante anos como diarreia da Cochinchina. A elucidação de seu ciclo evolutivo completo ocorreu apenas 50 anos após a descoberta do parasito (SIDDIQUI; BERK, 2001). As formas parasitárias foram primeiramente descritas por Bavay em 1876, como *Anguillula* (latim *Anguillula* = pequena enguia ou peixe longo e *stercus* = esterco) para as encontradas na luz intestinal e como *Anguillula intestinalis* para as obtidas em necropsia.

Outras espécies, tais como *Strongyloides venezuelensis* e *Strongyloides ratti* são muito utilizadas como modelos experimentais em roedores para estudo da infecção humana, bem como para a biologia do seu agente causador (TAKAMURE, 1995; GROVE, 1996, CHIUSO-MINICUCCI et al., 2010). Durante a infecção em roedores pelo *S. venezuelensis*, ocorre a migração das larvas através do pulmão antes de se estabelecerem na mucosa intestinal do hospedeiro sendo similar à migração de *S. stercoralis* em humanos (FERREIRA et al., 2007).

A infecção por *S. stercoralis* normalmente é auto-limitada e de baixa morbidade em indivíduos imunocompetentes. No entanto torna-se grave nos quadros de imunocomprometimento (FERREIRA et al. 1999; KEISER; NUTMAN, 2004; VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; MONTES et al. 2009). Pacientes imunossuprimidos como, por exemplo, pacientes com HIV/AIDS, pacientes sob tratamento com corticosteróides, pacientes transplantados, com neoplasias, tuberculose, subnutrição e/ou alcoolismo, têm sua resposta imune celular comprometida, e dessa forma estão predispostos ao desenvolvimento de infecções graves causadas pelo *S. stercoralis* (OLIVEIRA et al., 2002; FERREIRA, 2005; SILVA et al., 2005; MARCOS et al., 2008; VAIYAVATJAMAI et al., 2008). Outras doenças crônicas como, por exemplo, glomerulonefrite e diabetes mellitus também influenciam nos aspectos imunológicos, patogênicos e patológicos da strongiloidíase (MENDONÇA et al., 2006).

1.1 – Aspectos biológicos de *Strongyloides stercoralis*

As espécies de *Strongyloides* são os menores nematódeos e apresentam uma peculiaridade interessante: a única forma parasitária adulta presente no intestino delgado é a fêmea partenogenética, que se reproduz dentro do hospedeiro sem a presença do macho, liberando seus ovos no duodeno (GROVE, 1996).

Essas espécies têm ciclos evolutivos complexos, e possuem seis formas evolutivas, adultos parasitários e de vida livre, morfologicamente distintos. A maioria destes helmintos apresenta a habilidade de se manter alternando gerações homogônicas ou diretas em ciclos parasitários; e heterogônicas ou indiretas, em repetidas proles de vida livre (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; COSTA-CRUZ, 2005). As diferentes espécies do gênero têm ciclos de vida

semelhantes com alguns detalhes variando entre elas (ANDERSON, 2000; VINEY, LOK, 2007; FERREIRA et al., 2007).

As fêmeas partenogéticas triplóides ($3n$) se instalam na mucosa intestinal e liberam de 30 a 40 ovos por dia, produzindo simultaneamente, três tipos de ovos que originam as larvas rabditóides, estas são encontradas nas fezes ou em fluidos intestinais. As larvas rabditóides (L2): podem ser triplóides ($3n$), diplóides ($2n$) ou haplóides ($1n$), e são liberadas no interior do hospedeiro. As larvas filarióides (L3): triplóides ($3n$) originam-se a partir das larvas rabditóides. São as formas infectantes do parasita, sendo capazes de penetrar pela pele ou mucosas. As fêmeas diplóides ($2n$) e machos haplóides ($1n$) de vida livre são originados também a partir das larvas rabditóides (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2005). Estas fases evolutivas podem se desenvolver em dois ciclos distintos. O primeiro é o direto ou partenogénético, no qual as larvas rabditóides (L2) chegam ao meio externo levadas pelas fezes, onde transformam-se diretamente em larvas filarióides (L3) infectantes. O segundo ciclo é o indireto ou de vida livre, no qual as larvas rabditóides ($2n$) e ($1n$) transformam-se, respectivamente, em fêmeas e machos de vida livre, que por reprodução sexuada, originam larvas filarióides infectantes (L3) (GROVE, 1996).

Os hospedeiros humanos tornam-se infectados por *S. stercoralis* quando as larvas filarióides L3 penetram ativamente a pele íntegra ou ocasionalmente pelas mucosas, principalmente pela boca e esôfago quando são deglutidas através de alimentos contaminados. Essas larvas secretam proteases que auxiliam tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos. Após a penetração, as L3 caem na circulação sangüínea, passam pelo ventrículo direito, chegam aos capilares pulmonares onde se diferenciam em L4 e atravessam a membrana alveolar, migrando pela árvore brônquica até a faringe. As L4 então podem ser expectoradas pelo reflexo da tosse que provocam, ou são deglutidas, passando pelo esôfago, estômago e finalmente, atingem o intestino e se instalam na mucosa do duodeno e jejuno,

chegando à maturidade como fêmeas partenogénicas parasitas que iniciam a oviposição. Os ovos de *S. stercoralis* são eliminados já larvados na mucosa intestinal do hospedeiro humano e eclodem antes da eliminação das fezes. Este fato torna difícil a visualização deles nas fezes de humanos infectados, a menos que o indivíduo esteja com diarreia grave. O período pré-patente (da penetração de L3 à oviposição da fêmea) para *S. stercoralis* em humanos é de aproximadamente 8-25 dias (ANDERSON, 2000; COSTA-CRUZ, 2005).

A contaminação do solo pelo parasita resulta do hábito de defecação no chão. Para que as larvas rabditóides sobrevivam no solo, desenvolvam-se até adultos machos e fêmeas de vida livre e se multipliquem, são necessárias algumas condições ambientais. O solo deve ser arenoso, poroso, rico em matéria orgânica, úmido e com ausência de luz direta. A temperatura ótima varia entre 25 a 30°C, a evolução torna-se lenta entre 11 e 19°C, e abaixo de 8°C as larvas rabditóides tornam-se inviáveis (REY, 2001).

Este modo de transmissão descrito anteriormente é o modo usual, chamado de hetero ou primoinfecção, que ocorre através da pele, mas há outros tipos de infecção, como auto-infecção que é característica peculiar deste parasito (TAKAMURE, 1995; VINEY; LOK, 2007). A auto-infecção pode ocorrer tanto na forma externa (L2 na região perianal transformam-se em L3 e penetram nessa região) quanto interna (L2, ainda na mucosa intestinal, transformam-se em L3 que penetram na região do íleo e cólon), aumentando assim a carga parasitária. A auto-infecção é responsável pela longa permanência do parasita no hospedeiro e o principal fator no desenvolvimento das formas graves da estrogiloidíase (CARVALHO; PORTO, 2004). O processo de auto-infecção pode sofrer exacerbação com aumento do número de larvas e fêmeas partenogénicas, chamado de hiperinfecção que podem se disseminar por todo organismo e persistir por muitas décadas (COSTA-CRUZ, 2005; VINEY; LOK, 2007).

1.2 – Epidemiologia da estrogiloidíase humana

A estrogiloidíase tem distribuição mundial heterogênea, em áreas de predileção no sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África, algumas ilhas do Caribe e regiões dos Estados Unidos (GENTA, 1989, BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007; MARCOS et al., 2008). Estima-se que entre 30 e 100 milhões de pessoas no mundo encontram-se infectadas com *S. stercoralis* (KOSUBSKY; ARCHELLI, 2004; VINEY; LOK, 2007). Três regiões mundiais foram definidas de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (< 1%), endêmica (1-5 %) e hiperendêmica (> 5 %) (STUERCHLER apud PIRES; DREYER, 1993). As áreas endêmicas estão situadas, principalmente, entre os trópicos, especialmente, nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004; SANDOVAL et al., 2004; FARDET et al., 2007). Nas regiões desenvolvidas do mundo, como Sudeste da América do Norte e Europa, as infecções são freqüentes em trabalhadores do campo e também tem origem não autóctone em razão dos imigrantes e visitantes de áreas endêmicas (CELEDON et al., 1994; SIDDIQUI; BERK, 2001; MARCOS et al., 2008).

Entre as infecções causadas por geo-helminths, com transmissão via solo, a estrogiloidíase está entre os seis primeiros lugares, referindo-se apenas as infecções ativas, contudo o número de pessoas potencialmente expostas ou com quadro de infecção sub-clínico é muito maior (BETHONY et al., 2006; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2007).

No Brasil, a prevalência da estrogiloidíase varia de 3% a 82% representando grande importância na saúde pública. As maiores taxas de prevalência foram encontradas nos estados do Amapá, Goiás, Rondônia e Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). As taxas de infecção variam de acordo com a região analisada, o grupo populacional e os métodos de

diagnóstico parasitológico empregados pelos pesquisadores, o que dificulta a comparação dos dados (KOZUBSKY; ARCHELLI, 2004).

Em Minas Gerais, na cidade de Uberlândia, utilizando métodos parasitológicos foi reportado 13% de positividade em escolares (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998), 3,31% em crianças hospitalizadas (PAULA et al., 2000), 33,3% em alcoólatras (OLIVEIRA et al., 2002), 12% em pacientes HIV positivos (SILVA et al., 2005); 3,8% em pacientes diabéticos (MENDONÇA et al., 2006) e 4,4 % em puérperas lactantes (MOTA-FERREIRA et al., 2009).

1.3 – Aspectos clínicos da strongiloidíase humana

A maior parte dos indivíduos com strongiloidíase possui a forma assintomática ou apresentam manifestações clínicas brandas (ROSSI et al., 1993; SEGARRA-NEWNHAM, 2007). A patologia e a sintomatologia da strongiloidíase não estão somente relacionadas à carga parasitária, mas também a fatores do hospedeiro. Entre estes fatores estão a diminuição da resistência orgânica e o estado de nutrição do paciente, podendo evoluir com largo espectro de manifestações clínicas. A doença pode evoluir desde as formas assintomáticas ou oligossintomáticas em indivíduos com baixa carga parasitária, até formas graves e fatais em pacientes imunocomprometidos devido a desnutrição crônica, diabetes mellitus, lupus, insuficiência renal crônica, alcoolismo e corticoterapia prolongada (FERREIRA, et al., 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001; KEISER; NUTMAN, 2004; SILVA et al., 2005; GREINER; BETTENCOURT; SEMOLIC, 2008; VAIYAVATJAMAI et al., 2008).

Clinicamente, a forma aguda da strongiloidíase é pouco detectada em áreas endêmicas e as manifestações clínicas são decorrentes da penetração da larva na pele e da sua migração, causando erupção eritêmato-papulosa, pruriginosa, conhecida como larva *currens*. A forma crônica pode ser leve, moderada ou grave; quando é leve, geralmente é

assintomática. Nas formas moderada e grave podem ser reportados sinais e sintomas cutâneos, pulmonares e gastrointestinais mais sérios, há predomínio de manifestações digestivas como dor abdominal, diarreia e vômitos, sendo estas manifestações mais intensas na forma disseminada, podendo levar à desidratação, síndrome da má absorção, isquemia mesentérica, distúrbios hidroeletrolíticos, hipoalbuminemia e, em alguns casos, a íleo paralítico e obstrução intestinal. O envolvimento pulmonar acarreta em tosse e hemoptise decorrentes da migração larval. Nos casos mais graves há a possibilidade de ocorrer broncopneumonia, desenvolver cavitações e abscessos associados às infecções bacterianas. Nas formas graves da doença, o parasito pode ser encontrado em vários órgãos como: fígado, pulmão, coração e sistema nervoso central (FERREIRA et al., 1999; COSTA-CRUZ, 2005; VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; VELOSO; PORTO; MORAES, 2008).

1.4 – Tratamento da strongiloidíase humana

O tialbendazol e albendazol são drogas de escolha para o tratamento da strongiloidíase desde 1960, mas apresentam vários efeitos colaterais e são pouco eficazes para controle da endemia, desta forma a ivermectina droga inicialmente de uso na medicina veterinária, tem sido a mais empregada, sendo bastante efetiva e segura no controle de doenças endêmicas como a strongiloidíase humana (LINDO et al., 1996; FERREIRA et al., 1999, ZAHA et al., 2000; MILLER et al., 2008).

1.5 – Resposta imune do hospedeiro

A imunidade desenvolvida pelo hospedeiro mediante infecção por nematódeo pode ocorrer por meio de mecanismos de destruição do verme adulto ou das larvas durante a auto-

infecção. Na resposta imune estão envolvidas células T antígeno específicas que liberam citocinas e induzem a produção de anticorpos e mudanças inflamatórias (ONAH; NAWA, 2000; PORTO et al., 2002; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2007).

Estudos envolvendo a resposta imune contra helmintos tem sido realizada em modelos experimentais e, nestes casos há evidências de que tanto a resposta imune celular como a humoral estão envolvidas contra estes parasitos (MACHADO et al., 2005; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006; FINNEY et al., 2007).

Na maioria dos casos as respostas imunes dos hospedeiros contra os parasitos são similares, sendo respostas T- dependentes com perfil Th2, com a produção de Interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, envolvidas na sinalização das células (OVINGTON; BEHM, 1997; TURNER et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2005; MONTES et al., 2009). As interleucinas produzidas induzem rápida resposta humoral mediada por IgE, e resposta celular mediada por eosinófilos, basófilos, mastócitos, associados com a destruição das larvas e eliminação dos vermes (GENTA, 1996; WEINSTOCK; SUMMERS; ELLIOTT, 2005; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006).

Embora a resposta Th2 esteja associada com a proteção do hospedeiro na maioria dos modelos experimentais de infecção por helmintos em murinos, o exato mecanismo responsável por este fenômeno ainda não foi completamente esclarecido (LAWRENCE et al., 1995; NEGRÃO-CORRÊA, 2001).

Os antígenos do parasito são apresentados para os linfócitos T CD4+, via MHC (complexo de histocompatibilidade principal) classe II, que assim podem desempenhar sua função na resposta imune adaptativa. As células TCD4+ podem ser divididas em duas populações distintas de células T “helper” tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), baseado no perfil de citocinas secretadas. O perfil Th1 produz interferon-gama (IFN- γ) que é responsável pela resposta imune celular, enquanto as células Th2, associadas às respostas imunes contra

alérgenos e helmintos, secretam citocinas e cooperam com os linfócitos B na produção de anticorpos específicos. Como as células Th1 e Th2 secretam citocinas com funções antagônicas, existe uma modulação da atividade celular (ONAH; NAWA, 2000; PORTO et al., 2002; MACHADO et al., 2005; HIRATA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007).

No mecanismo T-independente há a produção, pelos macrófagos, de citocinas e mediadores da inflamação antígeno-inespecíficos. Estas moléculas são o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1) que atuam nas células caliciformes do intestino estimulando a proliferação das mesmas, e conseqüente 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 à sítios para oligossacarídeos presentes no tegumento dos parasitos (MARUYAMA et al., 2000, 2002; ONAH; NAWA, 2000; MACHADO et al., 2005).

A hipersensibilidade mediada pela IgE antígeno-específica é a mais rápida resposta imune efetora contra os parasitos e inicia-se quando os mastócitos já sensibilizados liberam os mediadores pré formados estocados em grânulos intracitoplasmáticos que incluem a histamina, heparina, proteases e fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos (GALIOTO et al., 2006). Níveis elevados de IgE foram demonstrados em pacientes imunocompetentes com *estrongiloídiase* (RODRIGUES et al., 2004), mas, na doença disseminada e os casos de imunossupressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade (PORTO et al., 2001; MARCOS et al., 2008). O ciclo do parasito sugere também que ele pode estimular a resposta local e sistêmica mediada por anticorpos IgA. Pacientes humanos sintomáticos graves apresentam redução significativa da

concentração de IgA e IgM, entretanto, não há alteração nos níveis de IgG (COSTA-CRUZ, 2005).

A IgG é a principal imunoglobulina do soro, correspondendo entre 70-75% do total de anticorpos séricos. A classe engloba 4 subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 distintas nas sequências de aminoácidos no domínio das cadeias constantes (OCHS; WEDGWOOD, 1987; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Entre as subclasses de IgG forma-se principalmente IgG1 e IgG4 na elaboração da resposta imune contra *S. stercoralis* (ATKINS et al., 1999; MACHADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2007). Acredita-se que IgG4 está envolvida no bloqueio da resposta protetora promovida pela IgE, ou seja, modula as respostas alérgicas IgE-mediadas pela ligação em sítios dos mastócitos (ATKINS et al., 1997; ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007). É possível que o aumento dos níveis de IgG4, que se segue às infecções primárias, reduza a expulsão dos parasitos, pelo fator mencionado anteriormente, o que permite o estabelecimento das fêmeas parasitas. Assim, a estrogiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas de hipersensibilidade (IgE-mediadas) para a persistente autoinfecção e, que conseqüentemente, reduz os efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante (ATKINS et al., 1997). No entanto, nos casos de doença disseminada e casos de imunossupressão, os níveis de IgE podem estar normais (MARCOS, 2008).

1.6 – Diagnóstico da estrogiloidíase humana

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é difícil de ser realizado, pois a maioria dos casos são assintomáticos ou quando com sintomatologia presente, os sintomas pulmonares e intestinais são comuns às outras parasitoses, dessa forma torna-se necessário a utilização de exames parasitológicos e imunológicos complementares (LIU; WELLER, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001; AGRAWAL; AGARWAL; GHOSHAL, 2009; ANAMNART et al., 2010).

Classicamente, o diagnóstico baseia-se em métodos parasitológicos que consistem na identificação de formas parasitárias de *S. stercoralis* nas fezes. As larvas podem também ser encontradas no fluido duodenal, lavado brônquico e ocasionalmente em fluidos e tecido do hospedeiro. Diversos relatos da presença de larvas rabditóides ou filarióides de *S. stercoralis* já foram detectados em broncoscopias (UPADHYAY et al., 2001), lavados broncoalveolares (LY et al., 2003; MAYAYO et al., 2005; GRAPSA et al., 2009), escarro (KIM et al., 2005) e fluido cérebro-espinhal (KOTHARY; MUSKIE; MATHUR 1999), principalmente em indivíduos sob corticoterapia. Recentemente foi encontrado larvas de *S. stercoralis* na urina de um paciente (PASQUALOTTO et al., 2009).

Em virtude da liberação de larvas nas fezes ser pequena e irregular, os métodos parasitológicos convencionais têm baixa sensibilidade. Várias técnicas são utilizadas para demonstrar as formas larvárias nas fezes, incluindo esfregaço direto em solução salina, método de concentração formol-éter (RITCHIE, 1948) e método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e suas variações, métodos de concentração por sedimentação, cultura em placa de ágar (ARAKAKI et al., 1988) e método de Harada-Mori (HARADA; MORI, 1955).

Uma única amostra de fezes examinada para a investigação de larvas propicia a detecção de cerca de 15 a 24% das infecções que não apresentam complicações, a sensibilidade do diagnóstico aumenta entre 55 e 78% se forem usadas três amostras fecais, podendo chegar perto de 100% com o uso de sete amostras (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001), porém como o exame de múltiplas amostras de fezes é bastante inconveniente para o paciente e consome muito tempo, a maioria dos médicos reluta em utilizá-lo (HIRA et al., 2004). Deste modo, a ausência de larvas em poucas amostras de fezes não pode ser interpretada erroneamente como ausência da

infecção, o que justifica com grande relevância a importância de realização de testes imunológicos para confirmar o diagnóstico (SIDDIQUI; BERK, 2001).

Testes imunológicos têm sido úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro, com a finalidade de esclarecimento do diagnóstico clínico, e em inquéritos soroepidemiológicos por apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (COSTA-CRUZ, 2005; RODRIGUES et al., 2007; MACHADO et al., 2008).

Apesar das dificuldades encontradas para obtenção e purificação de antígenos, já foram descritas diversas técnicas sorológicas que podem ser utilizadas no diagnóstico da *estrongiloidíase*. As principais são: imunofluorescência indireta (RIFI), *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *Western blotting* (MACHADO et al., 2001, 2003; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; VAN DOORN et al., 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009).

Estudos utilizando RIFI são direcionados para a pesquisa de diferentes classes de anticorpos com variações nas preparações antigênicas, como suspensão de larvas ou corte de larvas em criostato, e protocolo de montagem de lâminas (COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2001, 2003; RIGO et al., 2008; MOTA-FERREIRA et al., 2009). O teste ELISA é considerado superior aos outros testes sorológicos no que diz respeito à praticidade, automação, segurança e disponibilidade de reagentes, além disso, a sensibilidade do teste varia em torno de 85% a 95% e a especificidade pode chegar a 90% (ROSSI et al., 1993; LIU; WELLER, 1993; SCHAFFEL et al., 2001; KOOSHA; FESHARAKI; ROKNI 2004, VAN DOORN et al., 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009). A técnica *Western blotting*, também é indicada como altamente sensível e específica no reconhecimento de frações protéicas imunodominantes de *Strongyloides* (LINDO et al., 1994; ATKINS et al., 1999; PAULA et al., 2000; SILVA et al., 2003; RIGO et al., 2008). Estudos utilizando *Western blotting* no imunodiagnóstico da *estrongiloidíase* confirmam que esta técnica é altamente sensível e

específica no reconhecimento de frações protéicas da larva filarióide de *S. stercoralis* ou heterólogas por anticorpos no soro de pacientes com estrongiloidíase (SATO et al., 1990; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE 1999; RODRIGUES et al., 2004; MACHADO et al., 2008). As proteínas mais importantes reconhecidas pelos anticorpos tinham massas moleculares de 28, 31, 41 e 205 kDa. Outros trabalhos divergiram desses achados; foram realizados experimentos semelhantes, buscando proteínas que fossem reconhecidas pelos anticorpos de pacientes com estrongiloidíase e obtiveram grande variação nas massas moleculares das proteínas encontradas. Essa diferença nos resultados deveu-se, provavelmente, à utilização de extrato bruto de larvas de *S. stercoralis* e também às diferenças na padronização das técnicas (SATO et al., 1990; CONWAY et al., 1993b; CONWAY et al., 1994; ATKINS et al., 1999, SILVA et al., 2003, SUDRÉ et al., 2006). Devido à dificuldade na obtenção de quantidades suficientes de larvas de *S. stercoralis* para a produção dos extratos utilizados nos testes diagnósticos, tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos.

1.7 – Antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da estrongiloidíase humana

A principal limitação para o uso de antígeno homólogo em ensaios imunológicos é a dificuldade na obtenção de quantidades suficientes de larvas filarióides de *S. stercoralis*. Caso a amostra fecal não provenha de um paciente com hiperinfecção e considerável eliminação de larvas de *S. stercoralis* (SIDDIQUI; BERK, 2001), não se consegue número necessário de larvas para preparação antigênica. Além disso, a manutenção dessas larvas por meio de inoculação em cães e posterior coprocultura (LOOS, 1905 apud NEVES et al., 2005), representam problemas no que diz respeito a praticidade e segurança na rotina laboratorial,

uma vez que essa manutenção é considerada um método complexo, que requer tempo e oferece risco de infecção aos humanos pela manipulação de larvas infectantes viáveis do parasito (GROVE, NORTHERN, 1982; GROVE, 1996). Outra problemática se refere à dificuldade de acomodação e manutenção destes cães experimentalmente infectados.

Muitos pesquisadores vêm utilizando antígenos heterólogos, principalmente de *S. ratti* e *S. venezuelensis*, pois são de fácil obtenção, podem ser favoravelmente mantidos em ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar. A coprocultura não oferece risco de infecção helmíntica para os manipuladores e o tempo na estufa é reduzido. Assim pode-se manter a produção de antígeno heterólogo no laboratório de forma constante e segura (GROVE; BLAIR, 1981; NORTHERN et al., 1989; SATO et al., 1995a, COSTA-CRUZ et al., 1997; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2006; MACHADO et al., 2008). Estes estudos com modelos experimentais têm auxiliado, além da padronização de novas técnicas de imunodiagnóstico, nas pesquisas referentes à biologia molecular, terapêutica e aspectos da interação parasita-hospedeiro: ecologia, patologia e imunologia (NORTHERN et al., 1989; COSTA-CRUZ, 2005, FERNANDES et al., 2008; GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009).

A reação de imunofluorescência indireta, utilizando-se larvas de *S. stercoralis* ou *S. ratti* como antígenos (em cortes feitos com criostato), pode servir como subsídio para o diagnóstico da estrogiloidíase (COSTA-CRUZ et al., 1997, BOSCOLO et al., 2007). Estudos que também utilizaram antígenos de *S. stercoralis* ou *S. ratti* na técnica de *Western blotting* evidenciaram a presença de componentes antigênicos distintos, que podem ser utilizados como método adicional no diagnóstico. Da mesma forma, outros estudos utilizando antígenos de *S. ratti* no *Western blotting* encontraram 11 componentes antigênicos imunodominantes (SILVA et al., 2003) e 5 com alta taxa de sensibilidade e especificidade; (RODRIGUES et al., 2004).

A composição antigênica de *S. ratti* foi comparada com a de *S. stercoralis*, demonstrando-se que a primeira espécie pode ser utilizada como antígeno heterólogo para o diagnóstico em laboratório (NAGESWARAN; CRAIG; DEVANEY, 1994; SATO et al., 1995b). Apesar dos grandes avanços, ainda é necessária uma melhor comparação entre os componentes antigênicos imunodominantes dessas duas espécies de *Strongyloides* (GROVE; BLAIR, 1981; SATO et al., 1995a; COSTA-CRUZ et al., 1997; COSTA-CRUZ et al., 2003; SILVA et al., 2003; MACHADO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007).

Normalmente, as preparações antigênicas de *Strongyloides*, resultantes da extração de antígenos solúveis totais, não possuem adequada especificidade, pois representam o extrato bruto do parasito e possuem antígenos comuns a outros helmintos, favorecendo a reatividade cruzada (GAM; NEVA; KROTOSKI, 1987; CONWAY et al., 1993a,b; LINDO et al., 1994, 1996; ROSSI et al., 1993; SUDRÉ et al., 2006). Dessa forma, a caracterização e identificação de frações antigênicas de alta especificidade e sensibilidade, obtidas a partir do fracionamento de extratos totais de *S. venezuelensis*, por exemplo, auxiliarão nos estudos sorológicos e melhor compreensão da estrogiloidíase humana.

1.8 – Fracionamento por Triton X-114

A obtenção e a identificação de proteínas de alta especificidade obtidas a partir do fracionamento de extratos totais, constitui nova alternativa para obtenção de preparações antigênicas que possibilitem um diagnóstico mais preciso e confiável. O fracionamento destes extratos totais e análise das proteínas obtidas tem sido o principal objetivo de muitos estudos sorológicos no diagnóstico da estrogiloidíase (NORTHERN et al., 1989; KEREPESI et al., 2004, RIGO et al., 2008).

A separação de proteínas pode ser feita por meio de várias técnicas, e por meio da utilização de vários reagentes. Fracionamentos utilizando detergente não iônico Triton X-114 (TX-114) envolvem procedimentos simples e capazes de separar proteínas com características hidrofílicas de proteínas hidrofóbicas, presentes em um organismo. Este procedimento tem sido aplicado por vários autores e resultados satisfatórios têm sido obtidos devido à utilização da fração hidrofóbica (detergente) recuperada durante o fracionamento, demonstrando ser um promissor candidato a antígeno em sorodiagnóstico utilizando ELISA com substancial sensibilidade, especificidade e segurança. (COLLÉN et al., 2002; HÉNAFF; CRÉMET; FONTENELLE, 2002; MACHADO et al., 2007).

Os procedimentos de fracionamento que utilizam TX-114 além de simples, são considerados econômicos e altamente eficientes e apresentam outras vantagens quando comparado a outros métodos de purificação, uma vez que não necessitam de equipamentos especializados ou vários ciclos de ultracentrifugação. Além disso, apresentam baixa toxicidade em relação às extrações que utilizam solventes orgânicos (BORDIER, 1981; BRICKER et al., 2001; MANZOORI, BAVILI-TABRIZI, 2002).

A solução detergente TX-114 é um produto que possui forma homogênea a 0°C, mas com possibilidade de separar-se em fase aquosa e fase detergente em temperaturas superiores a 20°C. Durante o processo de fracionamento as proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fase aquosa e as proteínas integrais de membrana são recuperadas na fase detergente (BORDIER, 1981; NORTHERN, et al., 1989).

A obtenção e a identificação de antígenos de alta especificidade obtidas a partir de extratos salino e alcalino totais de espécies do gênero *Strongyloides* podem ser de grande aplicabilidade no diagnóstico da strongiloidíase.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais:

- ✓ Caracterizar e comparar as frações antigênicas detergente e aquosa obtidas a partir dos extratos salino (ES) e alcalino (EA) totais de *S. venezuelensis* no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana.

2.2 - Objetivos Específicos:

- ✓ Fracionar os extratos salino e alcalino por hidrofobicidade por meio do uso de Triton X-114 para obtenção das frações detergente e aquosa;
- ✓ Detectar anticorpos IgG específicos nas amostras de soro humano pelos testes ELISA e *Immunoblotting*, frente às seis preparações antigênicas;
- ✓ Comparar o potencial antigênico dos extratos totais e das frações obtidas, bem como a sensibilidade, especificidade e eficiência de diagnóstico para cada um, no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU sob o protocolo de N^o 353/08 e foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As amostras de soro utilizadas neste estudo foram provenientes do Banco de amostras Biológicas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, e sua manutenção foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFU) sob o protocolo de N^o 041/2008.

A manutenção da cepa de *S. venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob o protocolo de N^o 075/2008.

3.2 – Amostras de soro

Um total de 120 amostras de soro disponíveis no Banco de Amostras Biológicas, no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU foram utilizadas para validação dos testes diagnósticos. Constituem amostras de soro de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e voluntários da UFU.

Estas amostras foram distribuídas em 3 grupos de estudo:

Grupo 1 – 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *S. stercoralis*;

Grupo 2 – 40 amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, sendo: *Ascaris lumbricoides* (8), *Enterobius vermicularis* (6), *Schistosoma*

mansoni (4), *Hymenolepis nana* (6), *Taenia* sp. (3), *Giardia lamblia* (5) e Ancilostomídeos (8);

Grupo 3 – 40 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, baseado em sua história clínica e sem evidências de contato prévio com *S. stercoralis*, e que apresentaram diagnóstico parasitológico de fezes negativo para qualquer parasito.

Todos os indivíduos foram submetidos a exames parasitológico de fezes, realizados com três amostras de cada indivíduo, pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e o método de Lutz (1919) para identificação ou não de parasitos.

Três amostras de soro padrão positivo, previamente coletadas de indivíduos com diagnóstico confirmado para esrongiloidíase, e três amostras de soro padrão negativo de indivíduos aparentemente saudáveis, disponíveis no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses/UFU foram utilizados como controles das reações sorológicas.

3.3 – Obtenção de larvas filarióides (L3) de *S. venezuelensis*

A cepa L-2 de *S. venezuelensis* (Brumpt, 1934) foi isolada de roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta cepa foi mantida em *Rattus norvegicus* (Wistar), experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil.

Larvas filarióides de *S. venezuelensis* foram obtidas das fezes de ratos Wistar experimentalmente infectados e foram mantidas em cultura de carvão mineral por três dias a 28°C, em estufa BOD, segundo Loos (IN: NEVES et al., 2005), e foram recuperadas pelo método de Rugai et al., (1954). As L3 de *S. venezuelensis* depois de recuperadas e contadas

foram utilizadas na infecção de novos ratos *Wistar* para a manutenção da cepa, e outra parte foi conservada a -20°C para produção das preparações antigênicas.

3.4 – Preparação do extrato salino total de *S. venezuelensis*

O extrato salino total foi produzido a partir de alíquotas de 300.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis* conforme metodologia descrita por Rodrigues et al. 2007, com algumas modificações. As larvas foram descongeladas e ressuspensas em 100 µL de solução PBS a 0,15 M, pH 7,2. Depois foram trituradas no homogeneizador de tecidos por cinco ciclos de 5 minutos em banho de gelo. Posteriormente o homogenato foi submetido a 8 ciclos de ultrassom de 20 segundos em banho de gelo. O preparado foi incubado sob agitação lenta por 18 horas à 4°C e em seguida, centrifugado a 12400 x *g* por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, extrato salino, foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e estocado a -20 °C. O procedimento foi repetido para obtenção de quantidade necessária de antígenos para todos os procedimentos experimentais.

3.5 – Preparação do extrato alcalino total de *S. venezuelensis*

A extrato alcalino total foi preparado segundo Machado et al. (2003), com algumas modificações. Foram utilizadas alíquotas de aproximadamente 300.000 larvas filarióides de *S. venezuelensis*. No tubo contendo as larvas foi adicionado 100 µL de NaOH 0,15M e este preparado permaneceu em repouso por 6 h a 4° C sob agitação lenta. Posteriormente, foi acrescentado HCl 0,3M (Merck, RJ, Brasil) até atingir pH 7,0 e a mistura foi centrifugada a 12400 x *g* por 30 min a 4°C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e estocado a -20 °C. O procedimento foi repetido para obtenção de quantidade necessária de antígenos para todos os procedimentos

experimentais.

3.6 – Fracionamento do extrato salino e alcalino total de *S. venezuelensis* através de Triton X-114 para obtenção de frações hidrofóbica e hidrofílica

As frações antigênicas hidrofóbica (detergente) e hidrofílica (aquosa) dos dois extratos: salino e alcalino de *S. venezuelensis* foram obtidas como descrito por Bordier (1981), com algumas modificações, através do fracionamento com Triton X-114 (TX-114) (Sigma Chem. Co., St Louis, MO). Para cada extrato, foram preparados três lotes de fracionamentos com TX-114 para obtenção de antígenos suficientes para todas as reações sorológicas: ELISA e *Immunoblotting*.

Para cada lote, o processo de fracionamento partiu de uma massa protéica de 3 mg do extrato salino (ES) e extrato alcalino (EA) obtidos nos itens 3.2 e 3.3, respectivamente, na qual foi adicionada 600 µL de Tris (10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM NaCl) e 1% TX-114. A solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos (1ª etapa). Para separação das proteínas um gradiente de 6% de sacarose, 10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM NaCl e 0,06% de TX-114 foi adicionado, na proporção de 2:3, e incubado a 37°C por 10 minutos (2ª etapa). A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3000 x *g* a 25°C (3ª etapa). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico e a fração rica em detergente, ou seja, a fração mais densa foi armazenada no mesmo tubo (4ª etapa). Ao sobrenadante obtido na 4ª etapa foi acrescentado 1% de TX-114 a fresco, em seguida a solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos (5ª etapa). A solução obtida na 5ª etapa foi transferida para o tubo armazenado na 4ª etapa, e então mantida a 37°C por 10 minutos, centrifugada a 3000 x *g* a 25°C por 10 minutos (6ª etapa). O sedimento obtido na 6ª etapa constitui a fração detergente. Ao sobrenadante da 6ª etapa foi adicionado (1:1) de Tris e 4% de TX-114 sem sacarose. Esta solução foi homogeneizada e mantida em banho de

gelo por 10 minutos, posteriormente a 37°C por 10 minutos e centrifugada a 3.000 x *g* a 25°C por 10 minutos (7ª etapa). O sobrenadante desta etapa constituiu a fração aquosa (A), sendo os sedimentos descartados.

As frações proteínas detergente e aquosa purificadas (extrato salino detergente (ESD), extrato salino aquoso (ESA), extrato alcalino detergente (EAD) e extrato alcalino aquoso (EAA) foram precipitadas em acetona PA (Merck, RJ, Brasil) na proporção de 1:2 (v/v), a 4°C por 18 horas e centrifugadas a 3000 x *g*, a 4°C, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os precipitados ressuspensos em 300 µL de Tris. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (Sigma Chem. Co., St Louis, MO). Este procedimento é representado na Figura 1.

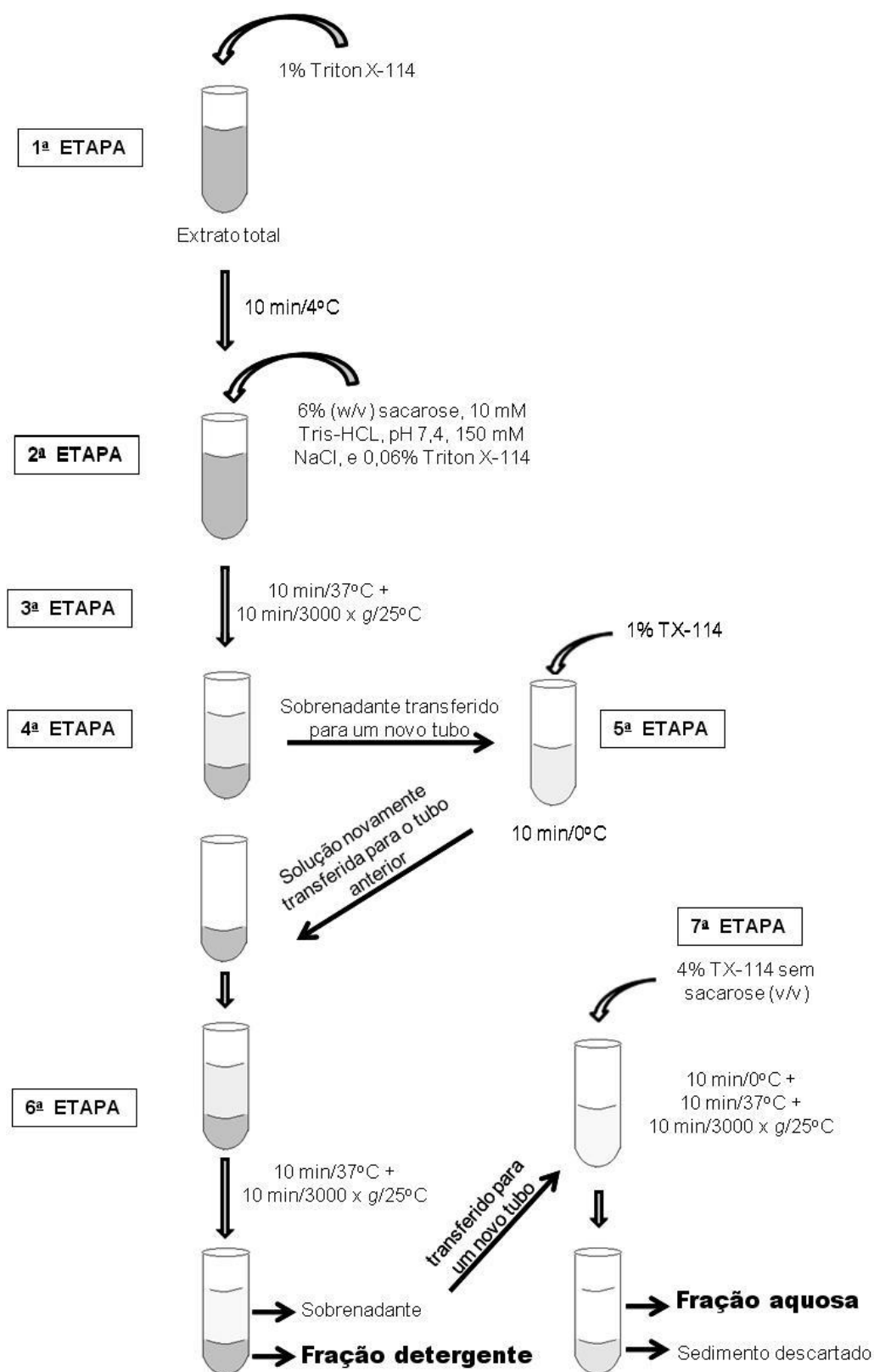


Figura 1. Esquema do processo de fracionamento através de Triton X-114. As frações detergente e aquosa foram precipitadas em acetona (1:2) a 4°C por 18 horas e centrifugadas 1580 x g por 30 minutos a 4°C.

3.7 – Perfil eletroforético das amostras antigênicas em SDS-PAGE

Para avaliar o perfil eletroforético dos dois extratos totais (ES e EA) e das respectivas frações ESD, ESA, EAD e EAA, os mesmos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % em condições desnaturantes e não redutoras segundo Laemmli, 1970.

O gel foi colocado entre placas de vidro medindo 10 x 8 cm, montadas com espaçadores de teflon de 0,75 mm de espessura.

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

O gel preparado foi adicionado lentamente entre as placas, tomando-se cuidado para evitar a formação de bolhas no interior do gel; as placas foram adequadamente seladas com solução de vaselina neutra e espaçadores de Teflon. Para evitar a polimerização do gel em presença de oxigênio foi adicionada uma camada de butanol (C₄H₁₀O, Vetec) a qual foi descartada após a polimerização do gel de separação.

Em seguida, foi realizada a preparação do gel de empilhamento com Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%; EDTA a 2mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida a 1%; água destilada; TEMED a 0,125% e APS a 0,125%. O gel de empilhamento foi depositado na placa sobre o gel de separação e moldado com o molde de teflon para a formação dos poços para aplicação das amostras. Após a polimerização completa deste, foram aplicadas as amostras antigênicas previamente incubadas por 5 minutos a 100°C, em concentração aproximada de 20 µg de proteínas por poço. No momento de uso, o material antigênico foi

diluído na proporção 1:1 em tampão de amostra (TRIS-HCl 0,1 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2% e água destilada). Foram aplicados também padrões de alto e baixo peso molecular (Sigma).

As placas de vidro foram encaixadas em cubas para eletroforese contendo tampão Tris-glicina a 0,025M pH 8,3 e a migração das proteínas realizada em corrente constante de 25 mA por aproximadamente 1 hora.

3.8 – Coloração do gel por nitrato de prata

A coloração do gel por nitrato de prata (AgNO_3 , Merck, RJ, Brasil) foi realizada segundo de Friedman (1982), no qual os polipeptídios se destacam em tons amarelo ferrugem.

Após a migração das proteínas o gel foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora constituída de metanol a 50% (Merck), ácido acético a 12% (Merck), formaldeído a 0,05% (Vetec, RJ), e água destilada, por uma hora ou por aproximadamente 20 horas. Em seguida, o fixador foi removido com etanol (Merck) a 50% em três banhos de 20 minutos cada. Posteriormente foi efetuado um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio penta hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 0,2% por um minuto. Em seguida, o gel foi lavado três vezes de 20 segundos cada, com água destilada, e impregnado, com solução de formaldeído a 37% adicionado de água e nitrato de prata (AgNO_3) a 2%, ao abrigo da luz por 20 minutos. O gel foi lavado em água destilada por três vezes de 20 segundos, e revelado com solução composta de 3 g de NaCO_3 , 25 μL de formaldeído e 1 mL de tiosulfato de sódio penta hidratado a 0,2% (Merck) até o aparecimento da cor. A reação foi interrompida com solução de metanol a 50% e ácido acético glacial a 12% e o gel foi depositado entre folhas de papel celofane para secar.

3.9 – Teste ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o ELISA (concentração de antígeno, condição de bloqueio da placa, diluição ideal de soro e conjugado a serem utilizados). Amostras de soro padrão (positivas e negativas) foram testadas nas diluições 1:50, 1:80 e 1:200, o conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase *Fc specific* (Sigma) foi testado nas diluições 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:4000 e foi testada a condição de bloqueio e não bloqueio da placa com PBS-TM 3% após sensibilização com 5 ou 10 µg de proteína por poço da placa.

Os testes ELISA para detecção de anticorpos IgG Anti-*Strongyloides* em amostras de soro do Grupo 1 (pacientes com estrongiloidíase), Grupo 2 (pacientes infectados com outras parasitoses) e Grupo 3 (indivíduos saudáveis) utilizando os extratos ES e EA de *S. venezuelensis* e os respectivos antígenos fracionados ESD, ESA, EAD e EAA foram realizados segundo a técnica descrita por SILVA et al., 2003, com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com 50 µL das amostras antigênicas na concentração ideal de 5 µg/mL diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) (Sigma), e bloqueadas com 200 µL de PBS-T a 0,05% contendo Molico a 3% (PBS-TM) e incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. As placas foram novamente lavadas três vezes por 5 minutos em PBS-T e foi adicionado 50 µL por poço das amostras de soro a serem testadas (diluídas 1:80 em PBS-T). Em todas as placas foram incluídos controles de reação que constituíram de três amostras de soro padrão positivo e três amostras de soro padrão negativo, além das amostras de soros dos grupos de estudo, a serem testadas. Após incubação por 45 minutos a 37°C e três lavagens de 5 minutos com PBS-T foi adicionado 50 µL de conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma), na diluição ideal de 1:2000. Após três lavagens de 5

minutos com PBS-T a reação foi revelada pela adição de 50 μL do substrato H_2O_2 (Merck) e solução cromógena de orto-fenilenodiamina - OPD (Sigma) preparado no momento do uso (10 mg de OPD + 25 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 10 μL de H_2O_2 30%). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 μL de solução de H_2SO_4 2N (Merck). A Figura 2 representa resumidamente as etapas do teste ELISA.

Os valores de Densidade Óptica (DO) foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus Flow Laboratories). Os resultados foram arbitrariamente expressos em índice de reatividade ELISA (IR), segundo fórmula $\text{IR} = (\text{DO amostra} / \text{DO cut off})$, sendo *cut off* calculado para cada placa, pelas médias das DO obtidas de 3 soros controles negativos acrescidas de 2 desvios padrões.

Os dados foram submetidos ao ‘*two-graph receiver operating characteristic*’ (TG-ROC), que avalia concomitantemente os valores de sensibilidade e de especificidade para obtenção com precisão do ponto ótimo (*cut-off*) da reação para cada extrato analisado (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995).

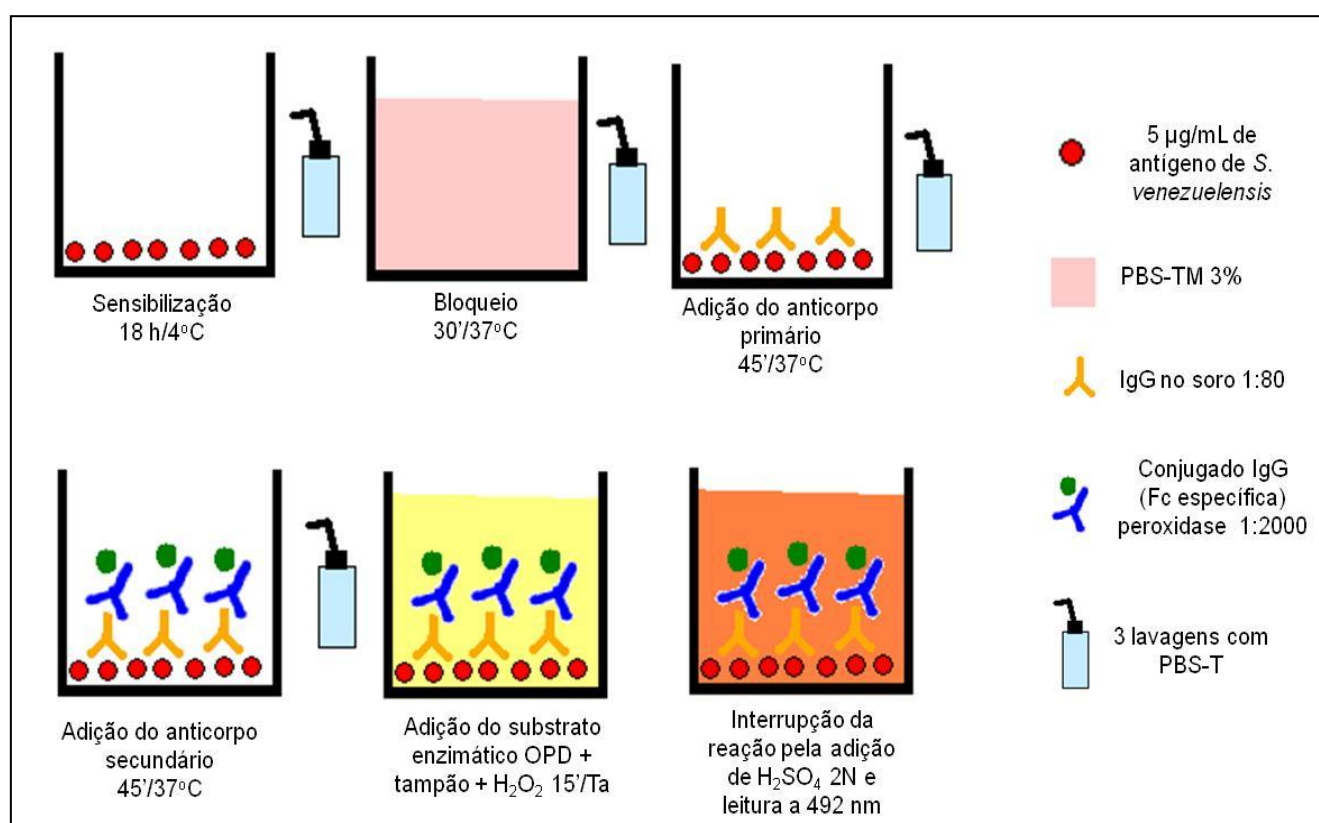


Figura 2. Esquema do ensaio imunoenzimático ELISA para determinação dos níveis de IgG específica frente aos seis extratos antigênicos de *S. venezuelensis*

3.10 – *Immunoblotting* para detecção de IgG

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o *Immunoblotting* (diluição ideal de soro e conjugado a serem utilizados). Amostras de soro padrão (positivas e negativas) foram testadas nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200, e o conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase *whole molecule* (Sigma Chem. Co., St Louis, MO) foi testado nas diluições 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1500, sendo que cada diluição do soro foi submetida às quatro diluições do conjugado.

A técnica *Immunoblotting* foi utilizada para caracterizar o perfil de proteínas das seis preparações antigênicas; extratos totais ES e EA de *S. venezuelensis*, e as respectivas frações detergentes (ESD e EAD) e aquosas (ESA e EAA); reconhecidas pelos anticorpos presentes nas amostras de soro dos Grupos 1, 2 e 3. Assim cada um dos seis extratos antigênicos foi submetido à SDS-PAGE a 12% (LAEMMLI, 1970), na concentração de aproximadamente 200µg de extrato por gel, juntamente com padrões de alto e baixo peso molecular.

Após a separação eletroforética, os componentes protéicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (0,45 µm - Sigma Chem. Co., St Louis, MO), utilizando sistema de transferência úmido (*Tanque Sub Eletrobotters - omniphor*) de acordo com TOWBIN; STAEHELIN; GORDON (1979), com algumas modificações. Foi preparado um “sandwich” com três folhas de papel filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas e mais três folhas de papel de filtro; todos umedecidos em tampão de transferência constituído de Tris 25 mM (Sigma), glicina 192 mM (Sigma Chem. Co., St Louis, MO) e metanol a 20%, e foram colocados em uma cuba de transferência para aplicação de corrente elétrica de 0,8 mA por cm², totalizando 120 mA e 250V, durante três horas.

Terminada a transferência cada a membrana de nitrocelulose foi corada em solução de Ponceau-S 0,5% (Sigma) em ácido acético 1%, para visualizar as frações antigênicas verificando-se a eficiência da transferência. As membranas de nitrocelulose foram cortadas

em tiras verticais de 3 mm de largura, lavadas com água destilada e bloqueadas com 1 mL de solução PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (Molico Nestlé, SP, Brasil) (PBS-TM 5%) por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação horizontal lenta, em câmara úmida. Após este período foi desprezada a solução bloqueadora, as tiras foram lavadas com 1 mL de solução PBS-T acrescido de 1% de leite desnatado (PBS-TM 1%) e foi adicionada às tiras 500µL das amostras de soro diluídas a 1:50 em solução PBS-TM 1%, e então foram incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta.

Posteriormente as tiras foram submetidas a 6 ciclos de lavagens por um período de 5 minutos cada com 1 mL de PBS-TM a 1%. O conjugado de cabra anti-IgG humana peroxidase (*whole molecule*) (Sigma) foi diluído em PBS-TM a 1% na diluição (1:1500) e 500 µL foi adicionado às tiras, incubando-as por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente as tiras foram lavas com 1 mL de PBS e a revelação da reatividade foi efetuada pela adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma) em PBS mais H₂O₂ 30%. Após a visualização das bandas antigênicas, a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada. As tiras foram secas em temperatura ambiente, identificadas de acordo com a amostra de soro e o antígeno usado, e então posteriormente foram analisadas.

3.11 – Normas de Biossegurança

Todo procedimento de colheita e manuseio do material biológico e dos reagentes e a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.12 – Análise Estatística

A sensibilidade, especificidade e a eficiência do diagnóstico (ED), bem como os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) foram calculados de acordo com Mineo et al. (2005).

Foram utilizadas as seguintes fórmulas com as seguintes definições: verdadeiro positivo (Vp), verdadeiro negativo (Vn), falso positivo (Fp) e falso negativo (Fn).

$$\text{Sensibilidade \%} = Vp \times 100 / (Vp + Fn)$$

$$\text{Especificidade \%} = Vn \times 100 / (Vn + Fp)$$

$$\text{ED \%} = (Vp + Vn) \times 100 / (Vp + Fp + Vn + Fn)$$

O peso molecular dos peptídeos foi estimado a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores em relação ao Rf (motilidade relativa), utilizando o “*Software GraphPad Prism versão 5.0*” (GraphPad Prism Software, Inc.). O Rf de cada peso molecular foi obtido através da fórmula:

$$Rf = \text{Distância da origem à migração} / \text{Distância da origem até o ponto de referência}$$

As análises estatísticas dos resultados do teste ELISA foram realizadas a partir do programa de computação “*Software GraphPad Prism versão 5.0*” (GraphPad Prism Software, Inc.) utilizando o teste Man-Whitney teste-U para comparação entre os grupos e teste de Kruskal-Wallis (H) para comparar os diferentes extratos antigênicos. As frequências dos componentes antigênicos reconhecidos por anticorpos IgG no *Immunoblotting* entre os

diferentes grupos foram comparadas utilizando o teste de Fisher. As diferenças foram consideradas significantes a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 - RESULTADOS

4.1 – Caracterização das seis preparações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis*

O processo de fracionamento utilizando TX-114 se iniciou a partir de uma concentração inicial de 3 mg de proteínas de cada extrato total. A concentração e o rendimento protéico das quatro frações antigênicas obtidas estão demonstrados na Tabela 1.

O perfil eletroforético dos antígenos totais, extrato salino (ES) e extrato alcalino (EA) de *S. venezuelensis*, e suas respectivas frações detergente (ESD e EAD) e aquosa (ESA e EAA), foram analisados em SDS-PAGE 12% pela coloração por nitrato de prata. ES mostrou bandas protéicas com peso molecular aparente de 131, 100, 82, 75, 58, 45 e 35 kDa; na fração ESD apenas duas bandas foram identificadas, sendo, uma com peso aparente de 105 e outra de 96 kDa, enquanto que na fração ESA foram identificadas bandas de 131, 93, 82, 75, 68, 45, 31, 28 e 24 kDa. As bandas visualizadas em EA apresentaram peso molecular aparente de 95, 75, 55, 31 e 28 kDa, enquanto que na fração EAD foram identificadas bandas de 144, 119, 93, 41 e 37 kDa e na fração EAA bandas de 144, 131-140, 94, 82, 55 e 45 kDa. Estes dados são demonstrados na Figura 3.

Tabela 1. Determinação da concentração e rendimento protéico das frações antigênicas de *S. venezuelensis* obtidas pelo tratamento com TX-114.

Frações Antigênicas	Proteínas (mg/mL)*	Rendimento (%)
ESD	0,7	22
ESA	1,4	47
EAD	0,9	30
EAA	1,3	43

* Concentração média calculada a partir de 3 lotes de cada fração antigênica obtida. ESD, extrato salino detergente; ESA, extrato salino aquoso; EAD, extrato alcalino detergente; EAA, extrato alcalino aquoso. Para o fracionamento com TX-114, partiu-se de uma concentração inicial de 3 mg de cada antígeno total.

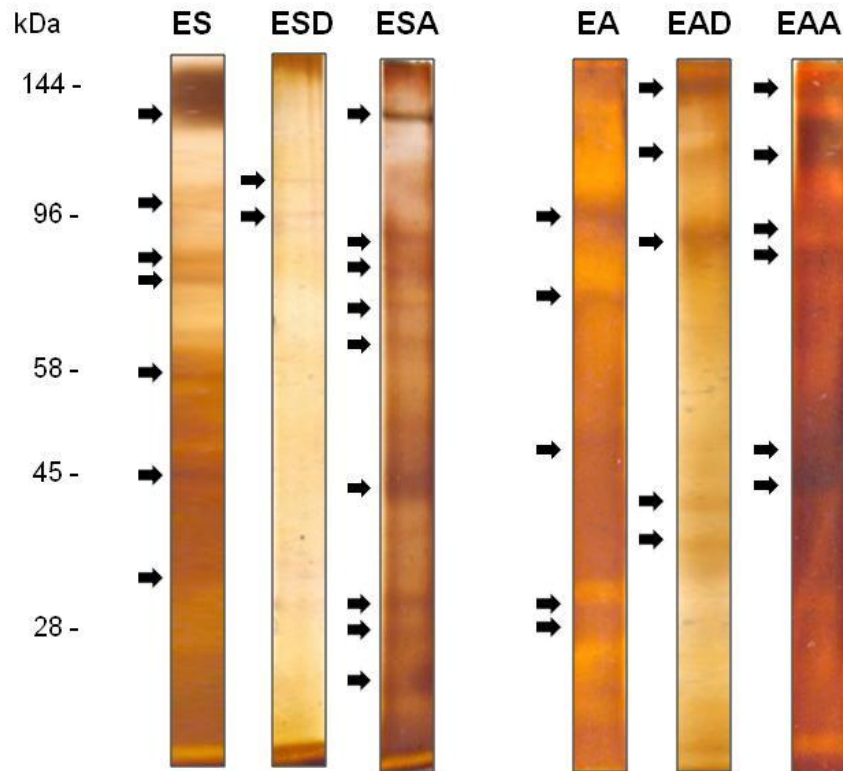


Figura 3. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% dos extratos salino total (ES) e alcalino total (EA) de *Strongyloides venezuelensis* e suas respectivas frações purificadas por TX-114, extrato salino detergente (ESD), extrato salino aquoso (ESA), extrato alcalino detergente (EAD) e extrato alcalino aquoso (EAA). Padrões de peso moleculares estão demonstrados à esquerda.

4.2 - ELISA para detecção de IgG anti-*Strongyloides* utilizando as seis preparações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis*

Todas as amostras de soro dos três grupos experimentais foram testadas pelo ELISA usando as seis preparações antigênicas: extrato salino total (ES), extrato salino detergente (ESD), extrato salino aquoso (ESA), extrato alcalino total (EA), extrato alcalino detergente (EAD) e extrato alcalino aquoso (EAA).

Os pontos de corte da reação para cada preparação antigênica foram determinados pelas curvas TG-ROC, estas estão representadas na Figura 4 identificando os pontos de corte para ES, ESD e ESA, em que foram definidas como positivas todas as amostras com índice de reatividade (IR) > 1,006 para ES; IR > 2,346 para ESD e IR > 1,294 para ESA. Na Figura 5 estão representados as curvas TG-ROC para EA, EAD e EAA e foram definidas como positivas todas as amostras com IR > 1,137 para EA; IR > 1,931 para EAD e IR > 1,051 para EAA. Estes valores estão sumarizados na Tabela 2.

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com strongiloidíase (Grupo 1), 40 pacientes infectados por outras parasitoses (Grupo 2) e 40 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3), respectivamente.

Os níveis de IgG sérica anti-*Strongyloides* determinados por ELISA, utilizando o extrato ES e suas respectivas frações (ESD, ESA) estão demonstrados na Figura 6 e os valores para o extrato EA e suas respectivas frações (EAD, EAA) na Figura 7. Exatamente, 95% (38/40) das amostras do Grupo 1 foram positivas para ESD, 90% (36/40) para ES e ESA, e os extratos EA, EAD e EAA apresentaram respectivamente 92,5 (37/40); 87,5 (35/40) e 77,5% (31/40) de positividade. No Grupo 2, 17,5% (7/40) e 20% (8/40) das amostras de soro positivaram quando utilizados os antígenos ES e ESA, e somente 10% (4/40) foram positivos para os antígenos da fração detergente do extrato salino (ESD). Considerando os extratos EA,

EAD e EAA a positividade nos pacientes com outras parasitoses correspondeu à 12,5 (5/40); 22,5 (9/40) e 25% (10/40) respectivamente. A reatividade cruzada das amostras do Grupo 2 está demonstrada na Tabela 6.

Todas as amostras do Grupo 3 permaneceram negativas quando utilizados os extratos ESD, ESA, EA e EAD, mas apenas um soro, ou seja 2,5% positivou com ES e quando utilizado o extrato EAA a positividade foi representada por 17,5% (7/40). A fração ESD apresentou os maiores valores (95%) de sensibilidade, especificidade e eficiência de diagnóstico. Os dados, referentes à sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico, valores preditivos positivo e negativo calculados para os testes ELISA utilizando as seis amostras antigênicas estão demonstrados na Tabela 7.

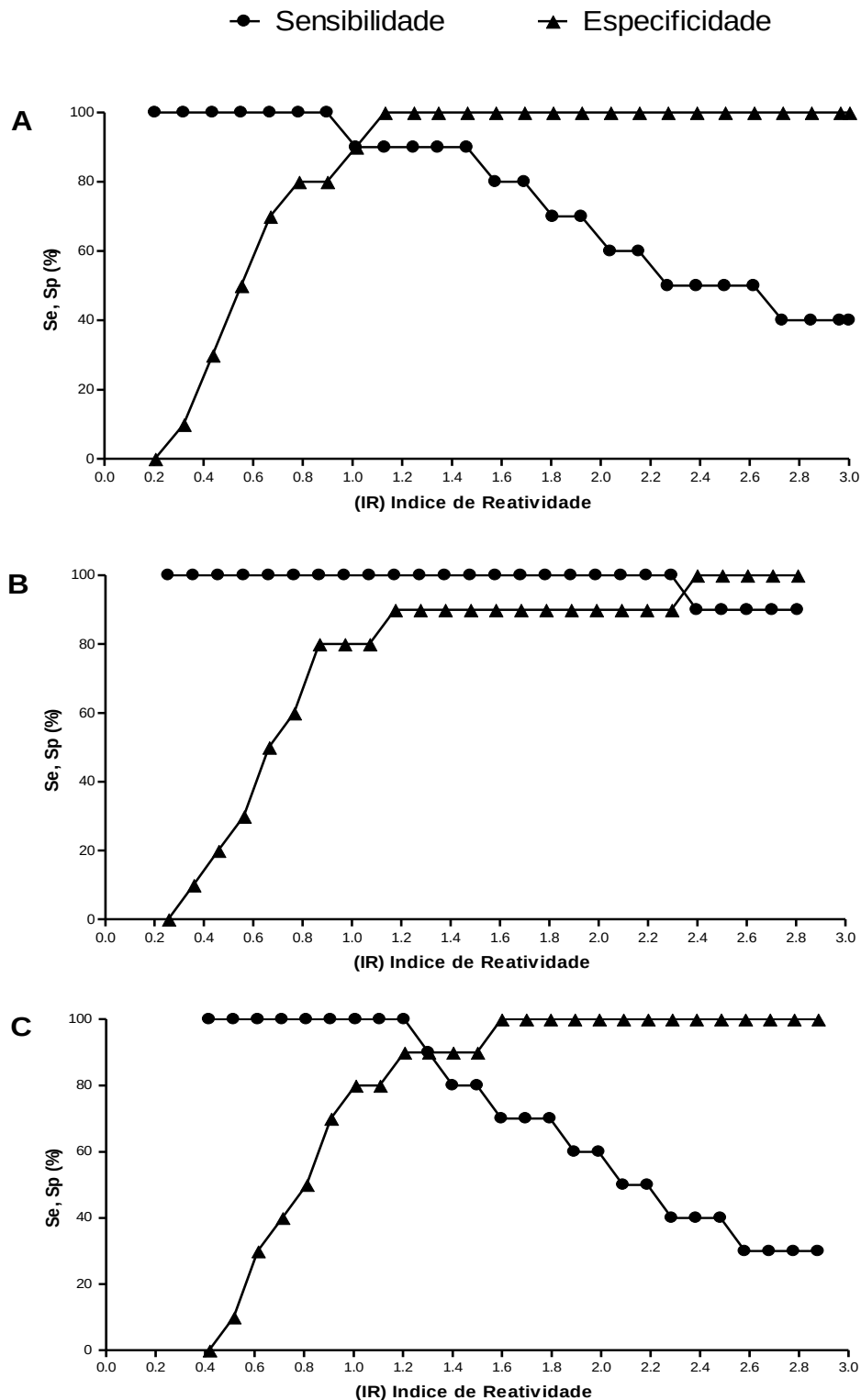


Figura 4. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-*Strongyloides* frente ao extrato salino total (ES) em A, e suas respectivas frações antigênicas detergente (ESD) em B, e aquosa (ESA) em C, obtidas pelo fracionamento com TX-114, em amostras de soro na diluição 1:80 dos indivíduos do Grupo 1 (pacientes com estrongiloidíase, n = 40) para o cálculo da sensibilidade (Se) e dos indivíduos do Grupo 2 (pacientes infectados com outras parasitoses, n = 40) e Grupo 3 (indivíduos saudáveis, n = 40) para o cálculo de especificidade (Sp). Ponto de corte da reação: com IR = 1,006 para ES; IR = 2,346 para ESD; IR = 1,294 para ESA.

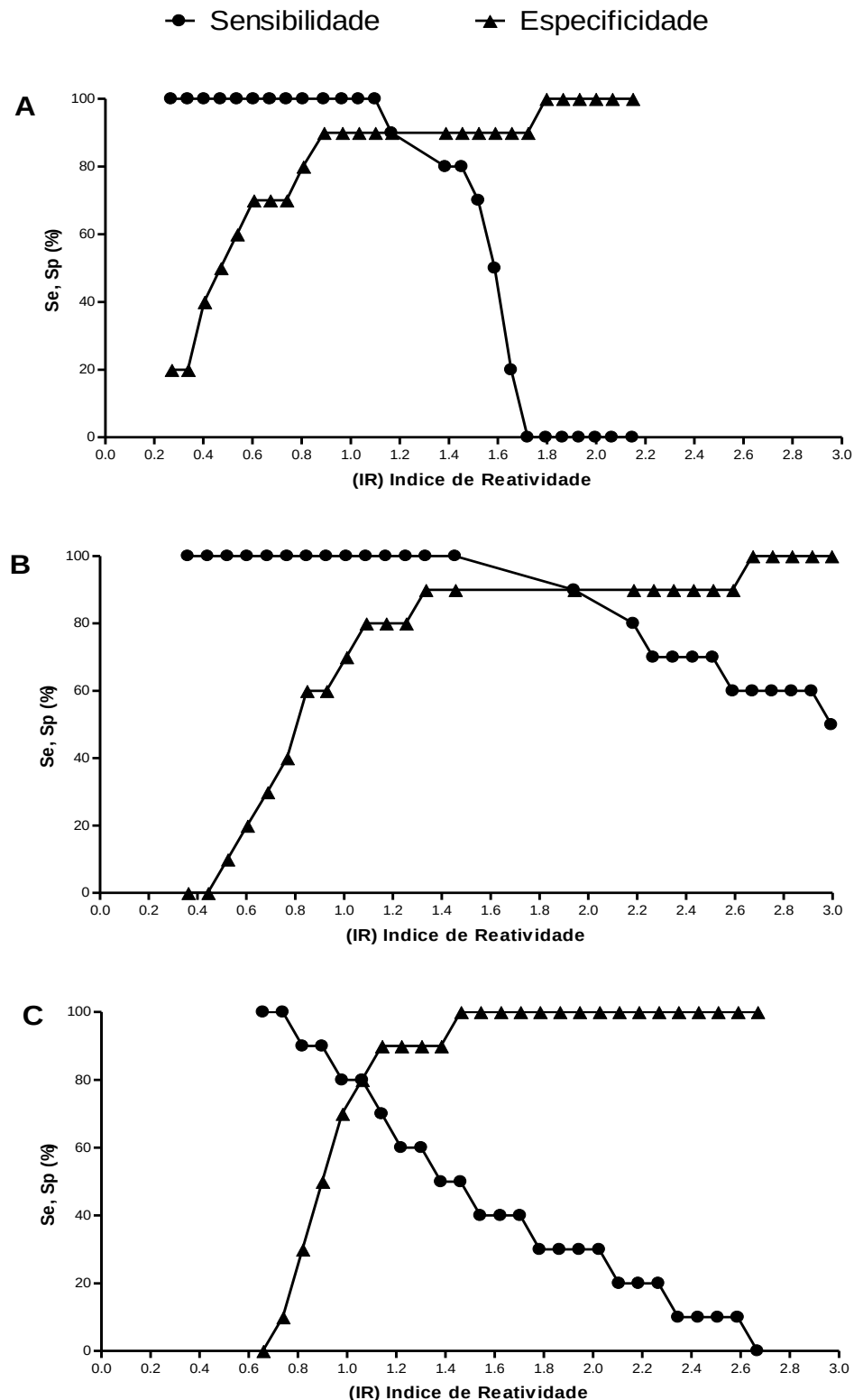


Figura 5. Análise TG-ROC no teste ELISA para detecção de IgG sérica anti-*Strongyloides* frente ao extrato alcalino total (EA) em A e suas respectivas frações antigênicas detergente (EAD) em B e aquosa (EAA) em C, obtidas pelo fracionamento com TX-114, em amostras de soro na diluição 1:80 dos indivíduos do Grupo 1 (pacientes com estrongiloidíase, n = 40) para o cálculo da sensibilidade (Se) e dos indivíduos do Grupo 2 (pacientes infectados com outras parasitoses, n = 40) e Grupo 3 (indivíduos saudáveis, n = 40) para o cálculo de especificidade (Sp). Ponto de corte da reação: com IR = 1,137 para EA; IR = 1,931 para EAD e IR = 1,051 para EAA.

Tabela 2. Pontos de corte do teste ELISA determinados pela análise TG-ROC, frente às seis preparações antigênicas: extratos salino total (ES) e alcalino total (EA) de *S. venezuelensis* e suas respectivas frações purificadas por TX-114; extrato salino detergente (ESD), extrato salino aquoso (ESA), extrato alcalino detergente (EAD) e extrato alcalino aquoso (EAA).

Extratos Antigênicos	Ponto de corte da reação (IR)*
ES	1,006
ESD	2,346
ESA	1,294
EA	1,137
EAD	1,931
EAA	1,051

* IR, Índice de Reatividade ELISA

Tabela 3. Resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com estrongiloidíase (Grupo 1) para a detecção de corpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando como antígeno extrato salino (ES) e respectivas frações detergente (ESD) e aquosa (ESA), extrato alcalino (EA) e respectivas frações detergente (EAD) e aquosa (EAA).

Amostra	ELISA					
	ES	ESD	ESA	EA	EAD	EAA
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	+
6	+	+	-	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+
12	+	+	-	+	+	-
13	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+
23	+	+	-	+	-	-
24	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+
27	-	+	+	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	-
31	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	-	+
33	-	+	-	-	+	-
34	+	-	+	+	-	+
35	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	-

- = Negativo; + = Positivo

Tabela 4. Resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com infecção por outras parasitoses (Grupo 2) para a detecção de corpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando como antígeno extrato salino (ES) e respectivas frações detergente (ESD) e aquosa (ESA), extrato alcalino (EA) e respectivas frações detergente (EAD) e aquosa (EAA).

Amostra	Parasito	ELISA					
		ES	ESD	ESA	EA	EAD	EAA
1	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	-	-	+	-
2	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
3	<i>A. lumbricoides</i>	+	-	+	-	+	+
4	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
5	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
6	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-	-	-
8	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	+	+	+	+
9	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
10	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	+	-
11	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
12	<i>E. vermicularis</i>	+	-	-	+	+	+
13	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
14	<i>E. vermicularis</i>	-	-	-	-	-	-
15	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	+
16	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
17	<i>S. mansoni</i>	-	-	-	-	-	-
18	<i>S. mansoni</i>	+	-	+	+	-	+
19	<i>H. nana</i>	-	+	+	+	+	+
20	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
21	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
22	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
23	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
24	<i>H. nana</i>	-	-	-	-	-	-
25	<i>Taenia</i> sp	+	+	+	+	+	+
26	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	-
27	<i>Taenia</i> sp	-	-	-	-	-	+
28	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
29	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
30	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
31	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
32	<i>G. lamblia</i>	-	-	-	-	-	-
33	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
34	Ancilostomídeo	+	-	+	-	+	+
35	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
36	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-
37	Ancilostomídeo	-	-	+	-	-	+
38	Ancilostomídeo	-	+	-	-	+	-
39	Ancilostomídeo	+	-	+	-	-	-
40	Ancilostomídeo	-	-	-	-	-	-

- = Negativo; + = Positivo

Tabela 5. Resultados dos testes ELISA dos 40 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3) para a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro, utilizando como antígeno extrato salino (ES) e respectivas frações detergente (ESD) e aquosa (ESA), extrato alcalino (EA) e respectivas frações detergente (EAD) e aquosa (EAA).

Amostra	ELISA					
	ES	ESD	ESA	EA	EAD	EAA
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	+
32	-	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	+
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-

- = Negativo; + = Positivo

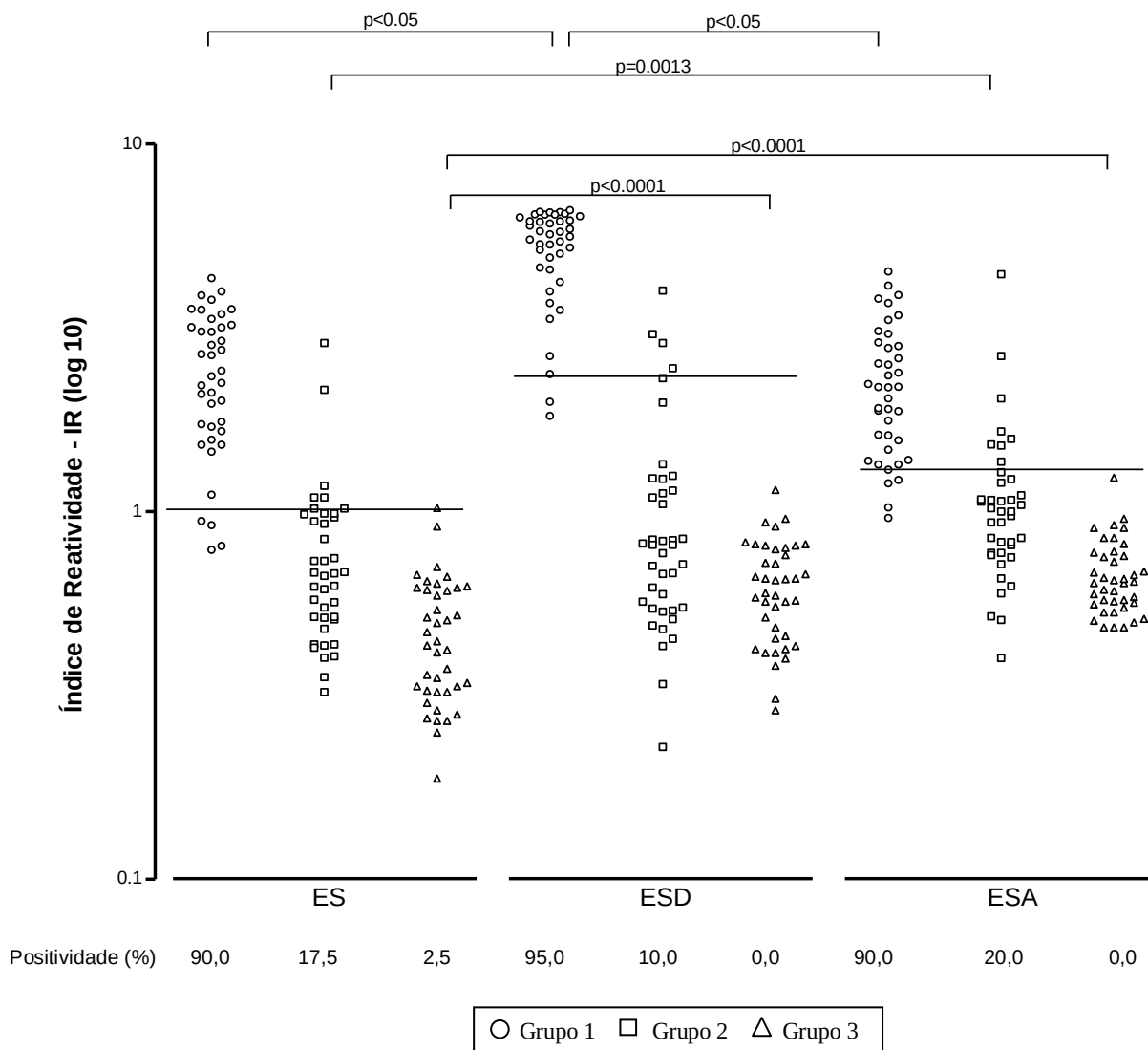


Figura 6. Detecção de IgG sérica anti-*Strongyloides* obtidos por ELISA em amostras de soro na diluição 1:80 dos indivíduos do Grupo 1 (pacientes com estrongiloidíase, n = 40); Grupo 2 (pacientes infectados com outras parasitoses, n = 40) e Grupo 3 (indivíduos saudáveis, n = 40), mediante utilização dos antígenos: extrato salino total (ES) e suas frações salino detergente (ESD) e salino aquosa (ESA) obtidas pelo fracionamento com TX-114. Os valores estão expressos em IR e a linha horizontal indica o ponto de corte da reação: com IR = 1,006 para ES; IR = 2,346 para ESD e IR = 1,294 para ESA.

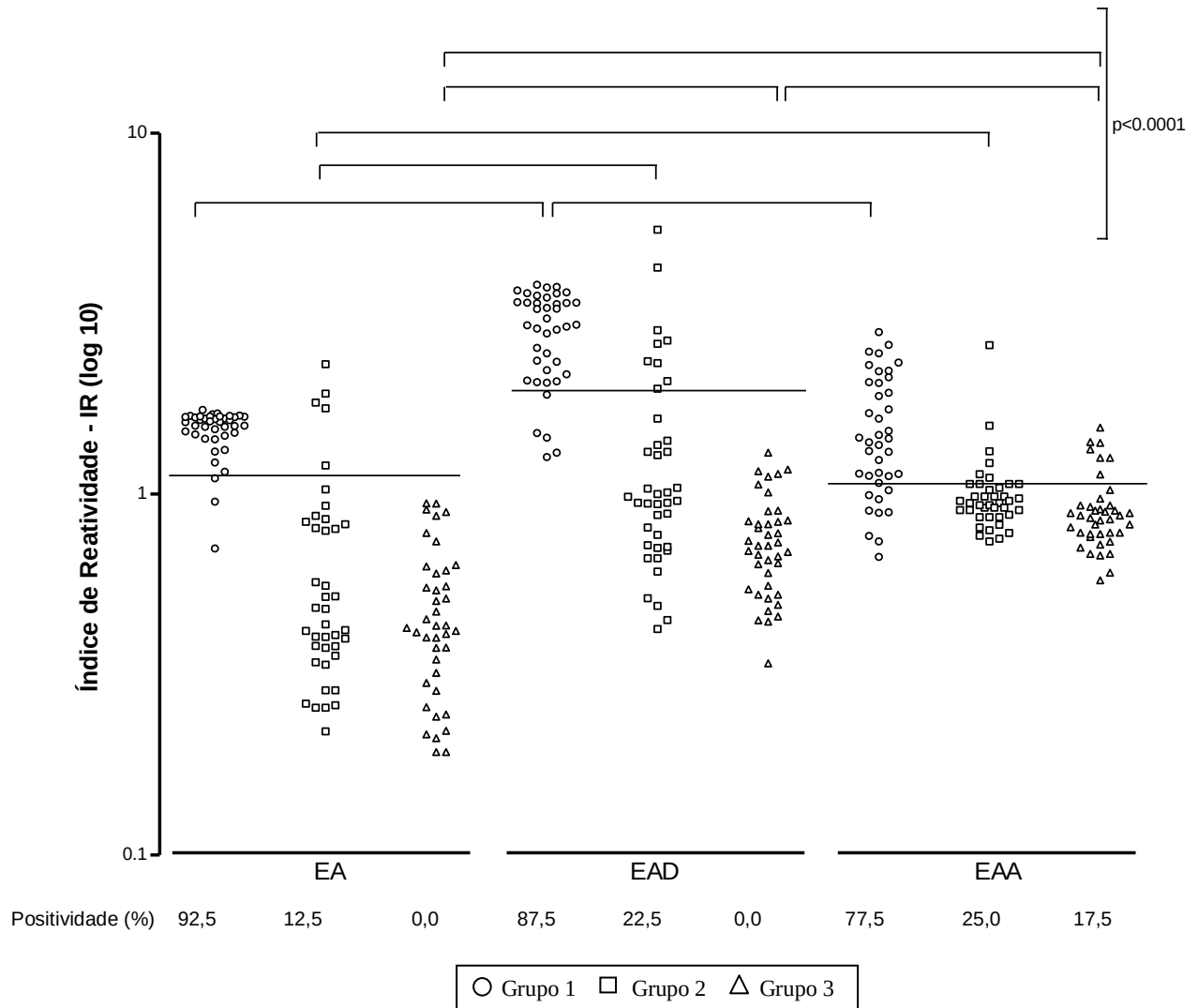


Figura 7. Detecção de IgG sérica anti-*Strongyloides* obtidos por ELISA em amostras de soro na diluição 1:80 dos indivíduos do Grupo 1 (pacientes com estrongiloidíase, n = 40); Grupo 2 (pacientes infectados com outras parasitoses, n = 40) e Grupo 3 (indivíduos saudáveis, n = 40), mediante utilização dos antígenos: extrato alcalino total (EA) e suas frações detergente (EAD) e aquosa (EAA), obtidas pelo fracionamento com TX-114. Os valores estão expressos em IR e a linha horizontal indica o ponto de corte da reação: com IR = 1,137 para EA; IR = 1,931 para EAD e IR = 1,051 para EAA.

Tabela 6. Reatividade cruzada pelos testes ELISA, em amostras de soro de pacientes infectados por outras parasitoses (Grupo 2, n = 40), utilizando como antígeno extrato salino total (ES) e respectivas frações detergente (ESD) e aquosa (ESA), extrato alcalino total (EA) e respectivas frações detergente (EAD) e aquosa (EAA) de *S. venezuelensis*.

	ELISA					
	n+ (%)					
	ES	ESD	ESA	EA	EAD	EAA
Grupo 2 (n=40)						
<i>A. lumbricoides</i> (n=8)	2 (25)	1 (12,5)	2 (25)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25)
<i>E. vermicularis</i> (n=6)	1 (16,7)	0	0	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)
<i>S. mansoni</i> (n=4)	1 (25)	0	1 (25)	1 (25)	0	2 (50)
<i>H. nana</i> (n=6)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)
<i>Taenia</i> sp (n=3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	2 (66,7)
<i>G. lamblia</i> (n=5)	0	0	0	0	0	0
Ancilostomídeo (n=8)	2 (25)	1 (12,5)	3 (37,5)	0	2 (25)	2 (25)
Total	7 (17,5)	4 (10)	8 (20)	5 (12,5)	9 (22,5)	10 (25)

n=amostras; n+ = número de amostras positivas

Tabela 7. Sensibilidade, especificidade, eficiência de diagnóstico, valores preditivos positivos e negativos na detecção de anticorpos IgG anti – *Strongyloides* em amostras de soro, utilizando o extrato salino total (ES), extrato alcalino total (EA), e as respectivas frações detergente, e aquosa; extrato salino detergente (ESD), extrato salino aquoso (ESA), extrato alcalino detergente (EAD), extrato alcalino aquoso (EAA) no teste ELISA.

Amostra antigênica	ELISA				
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED (%)	VPP	VPN
ES	90,0	90,0	90,0	0,82	0,95
ESD	95,0	95,0	95,0	0,90	0,97
ESA	90,0	90,0	90,0	0,82	0,95
EA	92,5	93,8	93,3	0,88	0,96
EAD	87,5	88,8	88,3	0,80	0,93
EAA	77,5	78,8	78,3	0,65	0,88

ED, Eficiência do Diagnóstico; VPP, Valor Preditivo Positivo; VPN, Valor Preditivo Negativo

4.3 – Immunoblotting para detecção de IgG anti-*Strongyloides* de *S. venezuelensis* utilizando extratos totais salino (ES) e alcalino (EA) e suas respectivas frações detergente e aquosa

Todas as amostras de soro dos três grupos de indivíduos foram testadas pelo *Immunoblotting* utilizando as seis preparações antigênicas. As amostras representativas do perfil de reatividade das proteínas reconhecidas pelo *Immunoblotting* estão demonstradas na Figura 8.

As bandas antigênicas reconhecidas por anticorpos IgG anti-*Strongyloides* foram consideradas imunodominantes quando reconhecidas por no mínimo 25% dos pacientes com estrongiloidíase (Grupo 1), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na comparação da porcentagem de marcação destas bandas nos outros grupos. Esta análise foi realizada em separado, para cada preparação antigênica. Os testes foram considerados positivos quando para cada antígeno o soro reagiu com ao menos uma banda antigênica considerada imunodominante. A porcentagem de reatividade das bandas antigênicas reconhecidas pelas amostras de soro dos Grupos 1, 2 e 3 de acordo com cada preparação antigênica estão demonstradas na Figura 9.

Nos extratos totais (ES e EA) foram reconhecidas bandas com peso molecular aparente de 126, 90, 55, 45-41, 33 e 28 kDa, sendo que para ES foram consideradas imunodominantes somente as bandas de 90, 55 e 45-41 kDa, e para EA as bandas de 45-41 e 33 kDa (Figura 9AD). No ES a banda imunodominante de 90 kDa foi reconhecida também por dois soros de indivíduos saudáveis, enquanto que a banda de 55 foi reconhecida em um paciente do Grupo 2 e quatro indivíduos do Grupo 3; neste Grupo apenas um indivíduo reconheceu a banda de intervalo entre 45-41 kDa, porém estas reações com Grupos 2 e 3 foram qualitativamente mais fracas, e as freqüência em relação aos soros de pacientes com estrongiloidíase (Grupo 1) foram menores, não interferindo estatisticamente no status

imunodominante destas bandas (Figura 9A). A mesma situação ocorre com as bandas imunodominantes de 45-41 e 33 kDa no EA, em que a primeira foi reconhecida em três pacientes do Grupo 2 e a segunda por apenas um indivíduo do Grupo 3 (Figura 9B).

Nas frações detergentes (ESD e EAD) foram reconhecidas bandas antigênicas de 126, 90, 55, 45-33 e 28 kDa, mas somente a banda de peso molecular aparente entre 45-33 foi considerada imunodominante para ambas preparações antigênicas (Figura 9BE), mesmo sendo reconhecida por um paciente do Grupo 2 e um indivíduo do Grupo 3 utilizando ESD (Figura 9B) e por dois pacientes do Grupo 2 e dois do Grupo 3 (Figura C).

Nas frações aquosas (ESA e EAA) foram reconhecidas proteínas da banda de peso molecular aparente entre 126-90 kDa, 55, 33 e 28 kDa (Figura 9CF), contudo a fração ESA apresentou como imunodominante apenas proteínas do intervalo entre 126-90 kDa que reagiram também com dois pacientes do Grupo 2 (Figura 9C), enquanto na fração EAA apenas a banda de 28 kDa se mostrou imunodominante, não reagindo com qualquer indivíduo dos Grupos 2 ou 3 (Figura 9F) apresentando desta forma, 100% de especificidade, no entanto esta fração apresentou sensibilidade muito baixa (45%).

As proteínas de peso molecular entre 45-41 kDa foram reconhecidas mais freqüentemente em pacientes do Grupo 1 empregando os extratos totais (ES e EA), e outra banda semelhante a esta, com um intervalo maior de proteínas, de peso molecular aparente entre 45-33 kDa foi identificada nas frações detergentes (ESD e EAD), não sendo visualizadas quando empregado as frações aquosas (ESA e EAA).

As bandas antigênicas que não foram consideradas imunodominantes de acordo com cada extrato, além de apresentarem reatividade com o Grupo 1, reagiram também com amostras de soro do Grupo 2 e/ou Grupo 3, não apresentando diferença estatística entre os grupos e não podendo desta forma serem consideradas específicas na identificação sorológica da *strongiloidíase* humana, levando em consideração o uso para cada extrato.

Para as frações detergentes ESD e EAD a reatividade foi observada principalmente com bandas antigênicas de baixo peso molecular e para as frações aquosas ESA e EAA a reatividade ocorreu principalmente com bandas de maior peso molecular, exceto reatividade com uma banda de 28 kDa em EAA.

As maiores sensibilidades no *Immunoblotting* foram obtidas quando utilizados os extratos total salino (ES) e fração detergente salina (ESD) com sensibilidade de 95% para ambas e os melhores valores para especificidade foram apresentados pela fração detergente (ESD) com 97,5% e pelas frações aquosas, 97,5% e 100% para ESA e EAA respectivamente, porém, estas últimas apresentaram menor sensibilidade, principalmente EAA. Em relação a eficiência de diagnóstico a fração ESD apresentou o melhor resultado, os valores podem ser verificados na Tabela 8.

A reatividade cruzada em *Immunoblotting* das amostras de soro dos pacientes infectados por outras parasitoses (Grupo 2) está demonstrada na Tabela 9, sendo a reatividade cruzada predominante em amostras de soro de pacientes com *Hymenolepis nana* e ancilostomídeos. E as amostras que tiveram reatividade cruzada identificaram os componentes antigênicos imunodominantes de 90, 55 e/ou 45-33 kDa.

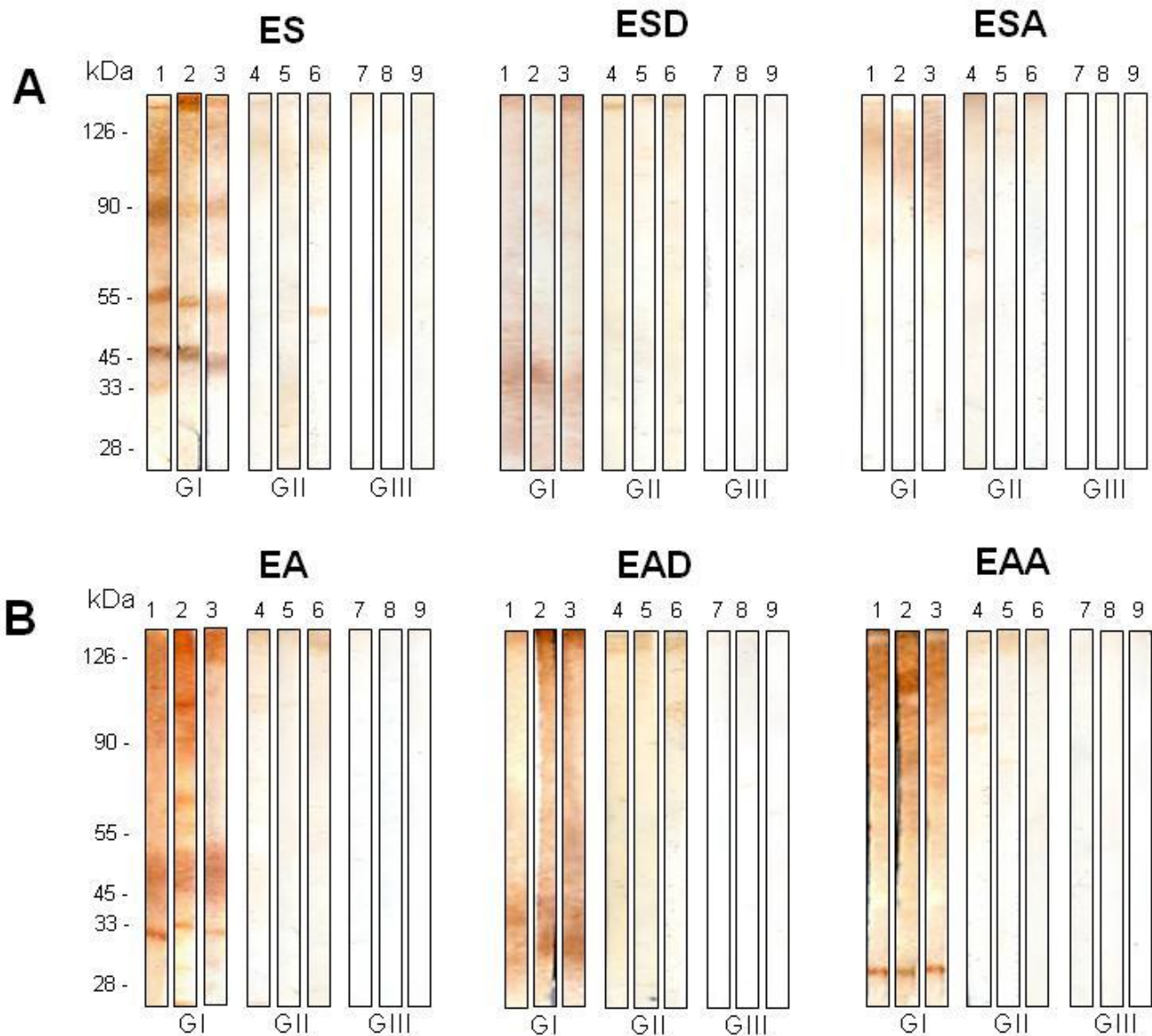


Figura 8. Amostras representativas do *Immunoblotting* de soro de indivíduos dos grupos, G1 (Grupo 1 – pacientes com *estrongiloidíase*, n = 40); G2 (Grupo 2 – pacientes infectados com outros parasitos, n = 40, 4-6: ancilostomídeos) e G3 (Grupo 3 – indivíduos saudáveis, n = 40), utilizando em A os extratos salino total (ES), salino detergente (ESD), salino aquoso (ESA) e em B os extratos alcalino total (EA), alcalino detergente (EAD) e alcalino aquoso (EAA).

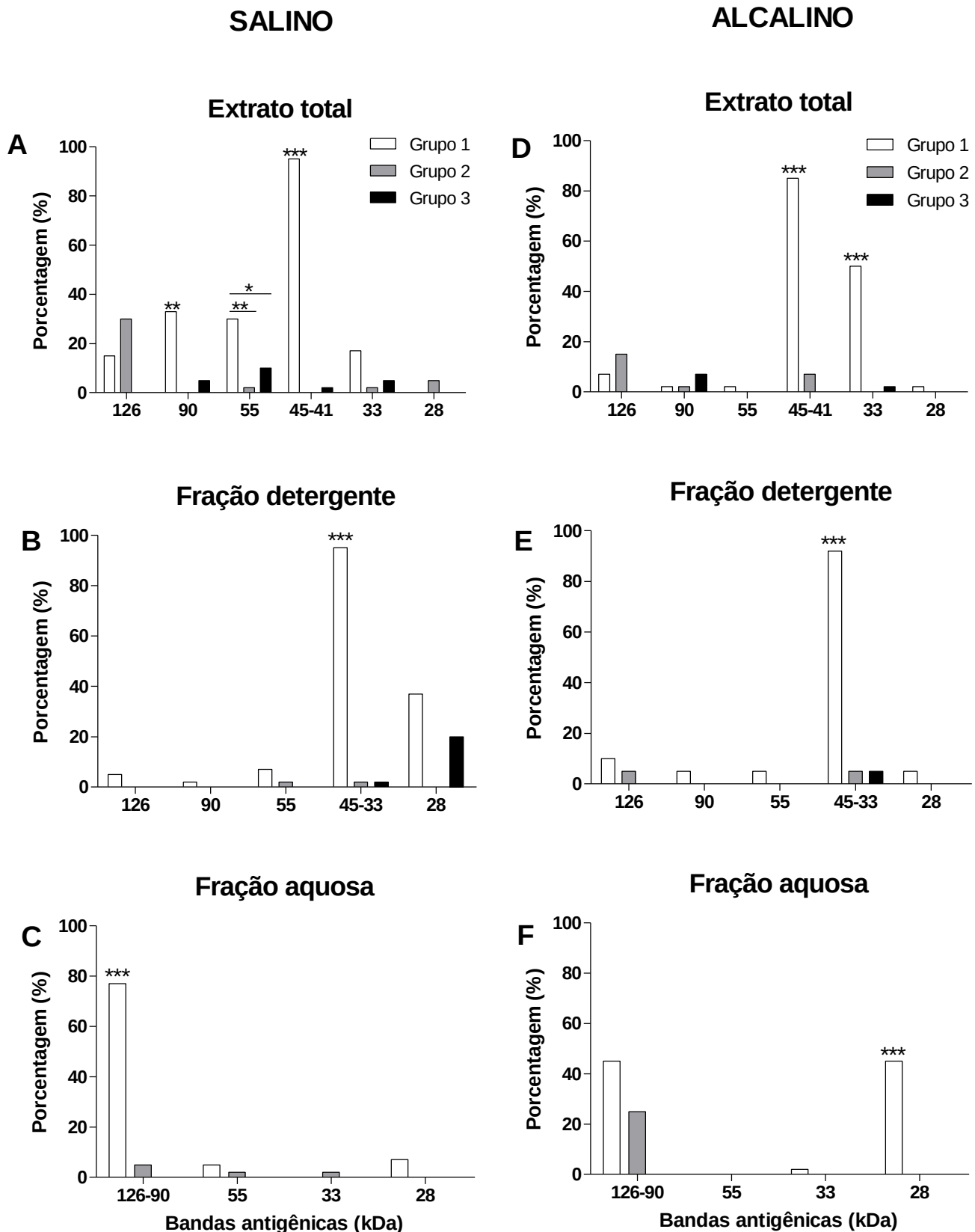


Figura 9. Porcentagem de reatividade das bandas antigênicas reconhecidas pelas amostras de soro dos indivíduos do Grupo 1 (pacientes com estrogiloidíase, $n = 40$); Grupo 2 (pacientes infectados com outras parasitoses, $n = 40$) e Grupo 3 (indivíduos saudáveis, $n = 40$) na diluição 1:50. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

Tabela 8. Sensibilidade, especificidade, eficiência de diagnóstico, valores preditivos positivos e negativos na detecção de anticorpos IgG anti – *Strongyloides* em amostras de soro, utilizando o extrato salino total (ES), extrato alcalino total (EA), e as respectivas frações detergente, e aquosa; extrato salino detergente (ESD), extrato salino aquoso (ESA), extrato alcalino detergente (EAD), extrato alcalino aquoso (EAA) na análise por *Immunoblotting*.

Amostra antigênica	<i>Immunoblotting</i>				
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	ED (%)	VPP	VPN
ES	95,0	92,5	93,3	0,86	0,97
ESD	95,0	97,5	96,7	0,93	0,98
ESA	82,5	97,5	92,5	0,94	0,92
EA	90,0	95,0	93,3	0,90	0,95
EAD	92,5	95,0	94,2	0,90	0,96
EAA	45,0	100,0	81,7	1,00	0,78

ED , Eficiência do Diagnóstico; VPP, Valor Preditivo Positivo; VPN, Valor Preditivo Negativo

Tabela 9. Reatividade cruzada pelo *Immunoblotting*, em amostras de soro de pacientes infectados por outras parasitoses (Grupo 2, n = 40), utilizando como antígeno extrato salino total (ES) e respectivas frações detergente (ESD) e aquosa (ESA), extrato alcalino total (EA) e respectivas frações detergente (EAD) e aquosa (EAA) de *S. venezuelensis*.

	<i>Immunoblotting</i>					
	n+ (%)					
	ES	ESD	ESA	EA	EAD	EAA
Grupo 2						
<i>A. lumbricoides</i> (n=8)	0	0	0	1 (12,5)	0	0
<i>E. vermicularis</i> (n=6)	0	0	0	0	0	0
<i>S. mansoni</i> (n=4)	0	0	0	0	0	0
<i>H. nana</i> (n=6)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	0
<i>Taenia</i> sp (n=3)	1 (33,3)	0	0	0	0	0
<i>G. lamblia</i> (n=5)	0	0	0	0	0	0
Ancilostomídeo (n=8)	0	0	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0
Total (n=40)	1(2,5)	1 (2,5)	2 (5)	3 (7,5)	2 (5)	0

n = amostras; n+ = número de amostras positivas

5 – DISCUSSÃO

A aplicabilidade de técnicas imunológicas utilizando antígenos de *Strongyloides* sp. tem papel fundamental no diagnóstico da estrogiloidíase humana, tanto no acompanhamento de pacientes durante o tratamento quanto em estudos soropidemiológicos. Devido à dificuldade na obtenção de quantidades suficientes de larvas filarióides de *S. stercoralis*, tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos, provenientes de *S. ratti* e *S. venezuelensis*. Estas espécies alternativas têm sido utilizadas em várias linhas de pesquisas, tais como, no estudo da biologia molecular, interação parasito-hospedeiro, ensaios terapêuticos e fontes de antígenos heterólogos para padronização de novas técnicas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ et al., 1997; SIDDIQUI; STANLEY; BERK, 2000). Embora extratos totais tenham sido amplamente utilizados é de grande importância o desenvolvimento e aplicação de técnicas que possibilitem a identificação e caracterização das proteínas antigênicas, provenientes de antígenos homólogos e heterólogos.

A separação de proteínas pode ser feita por meio de várias técnicas, e por meio da utilização de vários reagentes. Os procedimentos de fracionamento que utilizam o detergente não iônico Triton X-114 (TX-114) são considerados simples, econômicos e altamente eficientes, uma vez que não necessitam de equipamentos especializados ou vários ciclos de ultracentrifugação. Além disso, apresentam baixa toxicidade em relação às extrações que utilizam solventes orgânicos (BRICKER et al., 2001; MANZOORI, BAVILI-TABRIZI, 2002).

Neste estudo foi realizado pela primeira vez o fracionamento de extrato total de larvas filarióides de *S. venezuelensis* em duas frações detergente (hidrofóbica) e aquosa (hidrofílica), usando o detergente TX-114. Em vários estudos este detergente tem sido aplicado na recuperação de proteínas integrais de membrana, na identificação de proteínas imunógenas de

diversos outros parasitos, tais como: *Treponema pallidum* (CUNNINGHAM; WALKER; MILLER 1989), *Plasmodium* sp. (SMYTHE et al., 1988; SHARMA et al., 2007), *Schistosoma japonicum* (ROGERS et al. 1988), *Trypanosoma* sp. (BALBER; HO, 1988; ALVES et al., 2007), *Leishmania* sp. (MURRAY; SPITHILL; HANDMAN, 1989; HEATH et al., 1987; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2007) e *Taenia solium* (MACHADO et al., 2007). Resultados satisfatórios têm sido obtidos usando antígenos hidrofóbicos, ou seja, a fração detergente, onde o desempenho das proteínas integrais de membrana foram recuperadas, demonstrando ser um promissor candidato a antígeno em sorodiagnóstico de maior eficácia utilizando ELISA, (CHATUVERDI; GUPTA, 2002; GARG et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

Foi possível fracionar os extratos totais salino e alcalino de larvas filarióides de *S. venezuelensis* pelo Triton X-114 obtendo frações antigênicas distintas, sendo possível a discriminação destas frações pelo SDS-PAGE.

A análise das curvas TG-ROC para os testes ELISA possibilitou a obtenção de um ponto ideal de corte para cada amostra antigênica estudada. Os antígenos da fração detergente, principalmente os obtidos a partir do extrato salino mostraram maior especificidade que os outros extratos antigênicos. Houve apenas dois resultados falso-negativos para esse extrato, isso pode ser explicado pelo fato que esses dois pacientes apresentavam baixa titulação de anticorpos, além disso, apresentavam sintomas gastrointestinais como diarreia e dor abdominal. O cálculo da eficiência do diagnóstico reafirma o ótimo desempenho do ELISA utilizando as frações detergentes, em especial a fração detergente do extrato salino total (ESD).

As menores sensibilidades e especificidades das frações aquosas, principalmente a obtida a partir de extrato alcalino, tanto no ELISA quanto no *Immunoblotting* inviabiliza a utilização dessas frações para detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana. Esta afirmação pode ser confirmada devido à menor

quantidade de proteínas imunogênicas nas frações aquosas, uma vez que as proteínas consideradas específicas para imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana foram recuperadas nas frações detergentes, o que explica as maiores sensibilidades e especificidades nos testes diagnósticos realizados neste estudo, quando se empregou estas frações. E comparando-se estes parâmetros entre as frações detergente (ESD) do extrato salino total e a fração detergente (ESA) do extrato alcalino total, o primeiro (ESD) demonstrou resultados mais satisfatórios no que diz respeito à eficiência do diagnóstico.

A positividade observada em amostras de soro de pacientes com outras parasitoses (Grupo 2) tanto no ELISA quanto no *Immunoblotting* possivelmente ocorreu devido à reações cruzadas, e essa reatividade foi menor quando utilizou o antígeno da fração detergente do extrato salino (ESD). No ELISA, a reatividade cruzada por este antígeno foi observada somente em 10% das amostras de soro deste grupo, sendo quatro pacientes com monoparasitismo por *A. lumbricoides*, *H. nana*, *Taenia* sp e outro com ancilostomídeo. No *Immunoblotting* apenas o soro de um paciente infectado por *H. nana* apresentou reatividade cruzada quando se utilizou esta fração antigênica. Para os antígenos da fração aquosa de ambos os extratos salino e alcalino, a reatividade cruzada observada no ELISA e no *Immunoblotting* foi maior em relação a fração ESD, principalmente no ELISA reagindo com outros parasitas exceto *G. lamblia*. O Grupo 2, constituído por amostras de soro de pacientes infectados por outras parasitoses, é representativo da população geral, particularmente em países em desenvolvimento onde as doenças parasitárias são altamente prevalentes. Dessa forma, a reatividade cruzada nos testes sorológicos para estrogiloidíase podem ocorrer, principalmente com *Schistosoma* sp. e ancilostomídeos em testes como ELISA (LINDO et al., 1994; GROVE 1996; SITHITHAWORN et al., 2003).

Immunoblotting tem sido amplamente utilizado para caracterizar frações protéicas de *Strongyloides* sp. reconhecidas por diferentes classes de anticorpos (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE 1999; RODRIGUES et al., 2004). A maioria das proteínas

reconhecidas tem peso molecular de aproximadamente 28, 31, 41 e 205 kDa. Estudos têm mostrado reatividade com a banda protéica de 31 kDa em soros de pacientes positivos para infecção por *S. stercoralis* (CONWAY et al., 1993b; 1994). Uma única fração antigênica de aproximadamente 45 kDa foi reconhecida por anticorpos IgG usando diferentes linhagens de *S. venezuelensis* (MACHADO et al., 2008) e uma banda de aproximadamente 26 kDa foi visualizada utilizando esse mesma espécie de *Strongyloides* (SUDRÉ et al., 2007). Resultados similares foram encontrados por outros autores, no entanto com pequenas diferenças em relação ao peso molecular das bandas protéicas identificadas e essas pequenas diferenças no peso molecular pode estar relacionado à diferenças na padronização das técnicas utilizadas (SATO et al., 1990; ATKINS et al., 1999). Essas bandas descritas anteriormente são provavelmente equivalentes às bandas encontradas no presente estudo, e estas proteínas antigênicas mostram ser importantes ferramentas a serem utilizadas no imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

No presente trabalho cada extrato analisado em *Immunoblotting* apresentou um diferente perfil de proteínas antigênicas imunodominantes, que foram reconhecidas por maior parte de amostras de soro de pacientes do Grupo 1, de acordo com cada antígeno utilizado, o que permite afirmar, que constituem proteínas específicas que podem ser utilizadas no diagnóstico da strongiloidíase humana quando empregado as preparações antigênicas propostas neste estudo. As proteínas imunodominantes entre 45 e 33 kDa foram as principais que reagiram em todos os extratos, exceto nas frações aquosas, o que reforça a idéia de que essas frações não são consideradas viáveis para sua utilização em testes diagnósticos, uma vez que não contém essas proteínas potencialmente responsáveis na identificação de pacientes positivos para strongiloidíase. Essas proteínas foram responsáveis pela reatividade cruzada em algumas amostras de soro de pacientes com outras parasitoses, no entanto quando utilizado as frações detergentes a frequência da reatividade cruzada foi consideravelmente menor; 2,5% (1/40) ou 5% (12/40), além disso, essa banda de 43-33 kDa apresentou fraca

coloração pela prata. No Grupo 1, pela análise por *Immunoblotting*, houve duas amostras de soro que foram consideradas negativas para todas as preparações antigênicas, esses dois pacientes correspondem aos mesmos que apresentaram baixa reatividade no ELISA.

Pela análise por *Immunoblotting* pode ser observado que as frações detergentes apresentaram maior reatividade com proteínas de menor peso molecular, enquanto que nas frações aquosas, proteínas de peso molecular maior foram predominantes. As proteínas hidrofóbicas de membrana correspondem às proteínas integrais que geralmente possuem maior peso molecular, e neste trabalho apresentaram peso molecular menor. Diante disso, pode-se sugerir que essas proteínas sofreram quebras pela ação do detergente TX-114, mas não perderam sua especificidade, permanecendo os epítomos responsáveis pelo reconhecimento antigênico.

Considerando as vantagens na utilização da fração detergente obtida por fracionamento através de Triton X-114, pode-se considerar que essa fração é uma importante fonte de peptídeos específicos, sendo então eficiente no diagnóstico da *estrongiloidíase* humana. A utilização dos componentes antigênicos da fração detergente do extrato salino pode contribuir para estudos soroepidemiológicos para avaliar a situação dessa parasitose em muitos países.

6 – CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível fracionar com êxito os extratos salino e alcalino totais de *S. venezuelensis* por hidrofobicidade e caracterizar as respectivas frações detergente e aquosa;
- ✓ A fração hidrofóbica (detergente) obtida do extrato salino total de *S. venezuelensis* pode ser utilizada como antígeno heterólogo no imunodiagnóstico da estrongiloidíase humana pelos testes ELISA e *Immunoblotting*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia celular e Molecular**. 6^a ed, RJ, Brasill, Elsevier Science, p. 75-96, 2003.
- AGRAWAL, V.; AGARWALA, 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.
- ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; NOGUEIRA, N. F.; BOURGUINGNON, S. C.; SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M.S. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 44–52, 2007.
- ANAMNART, W.; PATTANAWONGSA, A.; INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W. Factors affecting recovery of *Strongyloides stercoralis* larvae: an approach to a newly modified formalin-ether concentration technique for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 97-100, 2010.
- ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Wallingford: C. A. B. International, 2000. 650 p.
- ARAKAKI, T.; HASEGAWA, H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Japanese Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 1, p. 11-17, 1988.
- ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A. 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, J. F.; LEE, M. G.; 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.
- AZEVEDO-PEREIRA, R. L.; PEREIRA, M. C.; OLIVERIA-JUNIOR, F. O.; BRAZIL, R. P.; CÔRTEZ, L. M.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, A. L.; TOMA, L.; ALVES, C. R. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 234-239, 2007.
- BAERMANN, G. T. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomon (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. mith H Geneesk. Batavia, **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BALBER, A. E.; HO, L. M. *Trypanosoma brucei gambiense*: partitioning of glycopeptides of bloodstream and procyclic forms in Triton X-114. **Experimental Parasitology**, v. 2, p. 290-293, 1988.

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.

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

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 1604-1607, 1981.

BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELM, M.; MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.; SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 129-133, 2007.

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L. L.; SEET, R. C. S.; 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. **The American Journal of Medicine**, v. 120, p. 545-551, 2007.

BRICKER, T. M.; PREVOST, M.; VU, V.; LABORDE, S.; WOMACK, J.; FRANKEL, L. K. Isolation of luminal proteins from spinach thylakoid membranes by Triton X-114 phase partitioning. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1503, p. 350-356, 2001.

CARVALHO, E. M.; PORTO, A. F. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology Immunology**, v. 26, p. 487-497, 2004.

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.

CHATURVEDI, V.; GUPTA, H. P. Evaluation of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana* for serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis: association between levels of antibodies and *Mycobacterium tuberculosis* antigens. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 33, p. 1-7, 2002.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de Biossegurança em Laboratórios. Uberlândia**: Universidade Federal de Uberlândia, 55p., 1997.

CHIUSO-MINICUCCI, F.; MARRA, N. M.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F.; FRANÇA, T. G.; ISHIKAWA, L. L.; AMARANTE, M. R.; AMARANTE, A. F.; 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.

COLLÉN, A.; PERSSON, J.; LINDER, M.; NAKARI-SETATA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; SIVARS, U. IF. A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endonuclease I-hydrophobin I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1569, p. 139-150, 2002.

CONWAY, D. J, ATKINS, N. S.; LILLYWHITE, J. E.; BAILEY, J. W; ROBINSON, R. D.; LINDO, J. F.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of 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., BIANCO, A. E. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **The Journal of infectious Diseases**, v. 168, p. 784-787, 1993b.

CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 99-105, 1994.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; de MELO, A. L.; LINARDI, P. M; ALMEIDA VITOR, R.W. **Parasitologia Humana**, 11 ed., São Paulo: Atheneu, p. 275-284, 2005.

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

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

CUNNINGHAM, T.M.; WALKER, E. M.; MILLER, J. N. et al. Selective release of *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with Triton x-114. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 5789-5796, 1989.

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.

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

FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T.; ESCHENAZI, P. D. H.; SCHILTER, C.; SOUSA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRAO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasites 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, S. A.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; NUNES-ARAÚJO, F. F. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.
- FINNEY C. A. M.; TAYLOR M. DM.; WILSON M. S.; MAIZELS R. M. Expansion and activation of CD4+CD25+ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 1874-1886, 2007.
- FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrilamid gels. **Annals of Biochemistry**, v. 126, p. 346-349, 1982.
- GALIOTO, A. M.; HESS, J. A.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; LEE, J. J.; ABRAHAM, D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5730-5738, 2006.
- 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.
- GARG, R.; SRIVASTAVA, J. K.; PAL, A.; NAIK, S.; DUBE. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania* promastigotes and evaluation of their prophylactic potential in hamsters against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 23, p. 1189-1196, 2005.
- GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.
- GENTA, R. M. The immune regulation of intestinal helminthiasis. In: PARADISE, L. J.; BENDINELLI, M.; FRIEDMAN, H. **Enteric Infections and Immunity**. Nova York: Springer, p. 239-252, 1996.
- 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, 2008.
- GRAPSA, D.; PETRAKAKOU, E.; BOTSOLI-STERGIOU, E.; MIKOU, P.; ATHANASSIADOU, P.; KARKAMPASI, A.; IOAKIM-LIOSSI A. *Strongyloides stercoralis* in a bronchial washing specimen processed as conventional and Thin-Prep smears: Report of a case and a review of the literature. **Diagnostic Cytopathology**, v. 37, p. 903-905, 2009.
- GREINER, K.; BETTENCOURT, J.; SEMOLIC, C. Strongyloidiasis: a review and update by case example. **Clinical Laboratory Science**, v. 21, p. 82-88, 2008.

- 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**, Amsterdam, 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.
- HARADA, U.; MORI, O. A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medica**, v. 1, p. 177-179, 1955.
- HEATH, S.; CHANCE, M. L.; HOMMEL, M.; CRAMPTON, J. M. Cloning of a gene encoding the immunodominant surface antigen of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 23, p. 211-222, 1987.
- HÉNAFF, M. L.; CRÉMET, J. Y.; FONTENELLE, C. Purification and characterization of the major lipoprotein (P28) of *Spiroplasma apis*. **Protein Expression and Purification**, v. 24, p. 489-496, 2002.
- 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.
- HIRATA, T.; NAKAMURA, H.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; KINJO, F.; YAMANE, N.; FUJITA, J. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 77 p. 683-684, 2007.
- KEISER, P.; NUTMAN, T. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology**, v 17, p. 208-217, 2004.
- KEREPESI, L. A.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; LUSTIGMAN, S.; HERBERT, D. R.; KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B.; KROLEWIECKI, A. J.; ABRAHAM, D. Human immunoglobulin G mediates protective immunity and identifies protective antigens against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1282-1290, 2004.
- KIM, J.; JOO, H. S.; KO, H. M.; NA, M. S.; HWANG, S. H.; IM, J. C. A case of fatal hyperinfective strongyloidiasis with discovery of autoinfective filariform larvae in sputum. **Korean Journal of Parasitology**, v. 43, p. 51-55, 2005.
- KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M. B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidosis. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 20, p. 36-40, 2004.

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

KOTHARY, N. N.; MUSKIE, J. M.; MATHUR, S. C. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **Radiographics**, v. 19, p. 1077-1081, 1999.

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

LAWRENCE, R. A.; ALLEN, J. E.; GREGORY, W. F.; KOPF, M.; MAIZELS, R. M. Infection of IL-4 deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a Th2 dominated immune response. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 5995-6001, 1995.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2. ed. Minneapolis: Burgess, p. 427, 1979.

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. **Transaction 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 diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 175- 179, 1994.

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

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

LY, M. N.; BETHEL, S. L.; USMANI, A. S.; LAMBERT, D. R. Cutaneous *Strongyloides stercoralis* infection: an unusual presentation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, p. 5157-5160, 2003.

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

- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; ALVES-OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate 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.; ALVES DE OLIVEIRA, J. B.; 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. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 3892-3899, 2005.
- MACHADO, G. A.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, p. 1369-1376, 2007.
- MANZOORI, J. L.; BAVILI-TABRIZI, A. Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 470, p. 215-221, 2002.
- MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOUZZO, 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.
- 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.; YABU, Y.; YOSHIBA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3749-3759, 2000.
- MAYAYO E., GOMEZ-ARACIL V., AZUA-BLANCO J., AZUA-ROMEIO J., CAPILLA J., MAYAYO R. *Strongyloides stercoralis* infection mimicking a malignant tumour in a non-immunocompromised patient. Diagnosis by bronchoalveolar cytology. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, p. 420-422, 2005.
- MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA-JÚNIOR, A.; COSTA-CRUZ, J. M. Is there an association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus. **Acta Tropica**, v. 99, p. 102-105, 2006.
- MILLER, M. A.; CHURCH, L. W.; SALGADO, C. D. *Strongyloides* hyperinfection: a treatment dilemma. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 336, p. 358-361, 2008.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 273p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 320, 2005.

MONTES, M.; SANCHEZ, C.; VERDONK, K.; LAKE, J. E.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G.; TERASHIMA, A.; NOLAN, T.; LEWIS, D. E.; GOTUZZO, E.; WHITE JUNIOR, A. C. Regulatory T Cell Expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v.3, p. 456, 2009.

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

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

MURRAY, P. J.; SPITHILL, T. W.; HANDMAN, E. Characterization of integral membrane proteins of *Leishmania major* by Triton X-114 fractionation and analysis of vaccination effects in mice. **Infection and immunity**, v. 57, p. 2203-2209, 1989.

NAGESWARAN, C.; CRAIG, P. S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology**, v. 108, p. 335-342, 1994.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosa. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 291-299, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; PEREIRA, A. T. M.; FERNANDES, A.; SCHEUERMANN, K.; SOUZA, A. L. S.; TEIXEIRA, M. M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006.

NEVES, D. P.; MELLO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, ed. 11, Belo Horizonte: Atheneu, 2005.

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.

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

- 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.
- ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p. 209-236, 2000.
- 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.
- PASQUALOTTO, A.C.; ZBOROWSKI MF, A. M.; POLONI, J. A.; SANTOS, A. P.; TORELLY, A. P. *Strongyloides stercoralis* in the urine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 103, p. 106-107, 2009.
- 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.
- PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**, 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 507-515, 1982.
- PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, p. 175-182, 1993.
- PORTO, A. F.; NEVA, F. A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCANTARA, L.; CARVALHO, E. M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 503-507, 2001.
- PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; OLIVEIRA-JUNIOR, J.; CARVALHO, E. M. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrongiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 641-649, 2002.
- PRIETO, L.H.1; FERNANDEZ, E.D. Caracterización y Análisis de la actividad antigénica de proteínas de la membrana germinal de *Echinococcus granulosus*. **InVet**, v. 8, p. 51-58, 2006.
- REY, L. Parasitologia. **Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 581-590, 2001.
- RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; AMATO NETO, V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 648-653, 2008.
- RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.
- RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1209-14, 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. 432-441, 2009.

RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CUNHA - JUNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 89-93, 2004.

ROGERS, M. V.; DAVERN, K. M.; SMYTHE, J. A.; MITCHELL, G. F. Immunoblotting analysis of the major integral membrane protein antigens of *Schistosoma japonicum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 29, p. 77-87, 1988.

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.; MATTON, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: Modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. V. 14, p. 5-8, 1954.

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

SATO, Y.; INQUE, F.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v. 84, p. 403-406, 1990.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Immunodiagnosis 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, 1995a.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 248-250, 1995b.

SCHAFFEL R, NUCCI M, CARVALHO E, BRAGA M, ALMEIDA L, PORTUGAL R, PULCHERI W. The value of an immunoenzymatic test (Enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 346-350, 2001.

SEGARRA-NEWNHAM, M. Manifestations, diagnosis, and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, p. 1992-2001, 2007.

SERINO-JUNIOR, J. C.; ALMENARA, D. P.; PENHA-SCARABOTTO, C.; DE MOURA, J. P.; WINTER, C. E. Vitellin-binding proteins in the nematode *Oscheius tipulae* (Nematoda, Rhabditida). **Comparative Biochemistry and Physiology, B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, p. 330-335, 2008.

SHARMA, S. K.; GUPTA, C.; DWIVEDI, V.; MISRA-BHATTACHARYA, S.; MOHAMMAD O. Prophylactic potential of liposomized integral membrane protein of *Plasmodium yoelii nigeriensis* against blood stage infection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, p. 2103-2111, 2007.

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

SIDDIQUI, A. A.; STANLEY, C. S.; BERK, S. L. A cDNA encoding the highly immunodominant antigen of *Strongyloides stercoralis*: gamma-subunit of isocitrate dehydrogenase (NAD⁺). **Parasitology Research**, v. 86, n. 4, p. 279-283, 2000.

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

SILVA, 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.

SITHITHAWORN, P.; SRISAWANGWONG, T.; TESANA, S.; DAENSEEKAEW, W.; SITHITHAWORN, J.; FUJIMAKI, Y.; ANDO, K. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 398-402, 2003.

SMYTHE, J.; COPPEL, R. L.; BROWN, G. V.; KEMP, D. J.; ANDERS, R. F. Identification of novel integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 5195-5199, 1988.

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

SUDRÉ, A. P.; SIQUEIRA, R. C.; BARRETO, M. G.; PERALTA, R. H.; MACEDO, H. W.; PERALTA, J. M. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1117-1123, 2007.

TAKAMURE, A. Migration Route of *Strongyloides venezuelensis* in Rodents. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 907-911, 1995.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

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. 1786-1775, 2003.

UPADHYAY, D.; CORBRIDGE, T.; JAIN, M.; SHAH, R. Pulmonary hyperinfection syndrome with *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Medicine**, v. 111, p. 167-169, 2001.

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. 8, 2006.

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

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

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

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 30 nov. 2009.

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

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