Marcelo Andreetta Corral

**Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana frente a
diferentes frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek

São Paulo

2014

Marcelo Andreetta Corral

**Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana frente a
diferentes frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Corral, Marcelo Andreetta

Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana frente a diferentes frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* / Marcelo Andreetta Corral. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryscek.

Descritores: 1.Estrongiloidíase 2.*Strongyloides venezuelensis* 3.Imunodiagnóstico 4.Antígenos de Helmintos 5.Ensaio de imunoadsorção enzimática 6.Western blotting

USP/FM/DBD-094/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Heloisa Helena Andreetta Corral

José Mario Garcia Corral

“Não morrem os que deixam

o afeto como herança.”

À memória do meu avô Aldo Andreetta

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças e inspiração para realizar esse trabalho de mestrado.

Agradeço enormemente ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek por acreditar no meu potencial, por me incentivar a sempre progredir e alcançar meus objetivos profissionais, pela confiança, compreensão, orientação e pela oportunidade para realizar esse trabalho. Agradeço também por sempre se mostrar disponível e ser um modelo de sucesso ético e acadêmico profissional.

À Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula por toda ajuda laboratorial, pelos ensinamentos, pelas orientações, apoio e especialmente por proporcionar as idas a Ouro Preto. Sem você, não teríamos conseguido chegar onde chegamos!

Ao Prof. Dr. William de Castro Borges e toda equipe maravilhosa do laboratório de Enzimologia e Proteômica da UFOP, que me receberam de braços abertos e me permitiram conhecer um pouco mais sobre meu parasito de estudo.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi, porta de entrada nesse laboratório. Obrigado por acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, à Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e à Profa. Dra. Beatriz Stolf pelos valiosos conselhos e orientações no meu exame de qualificação.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Basile, pela oportunidade de participar das disciplinas Metodologia do Ensino I e II e por permitir que eu fosse seu monitor, seus conselhos e o aprendizado foram extremamente valiosos.

A melhor amiga e companheira de laboratório: Maiara Gottardi. Meu ponto de equilíbrio no laboratório. Agradeço-te muito por toda ajuda, amizade, cumplicidade e confiança que desenvolvemos nesse período desde antes do mestrado. Sua presença foi fundamental, principalmente nos momentos de desmotivação.

À Caroline Furtado Noble amiga e companheira. Agradeço toda sua ajuda, sobretudo nos momentos de descontração!

Aos amigos que agreguei nessa jornada e agora são para a vida toda: Alda Graciele Almeida, Anelize Sartori, Ariana Carolina Ferreira, Cristiana Trinconi Tronco, Gessica Baptista de Melo, João Paulo Moreira, Karen Oliveira, Livia Botelho Lima, Osmar Vieira Ramires Junior, Pablo Espinosa Gill, Priscilla Duarte Marques, Susana Lima Lessa Lôbo, Tatiane Assoni dos Santos e William Roldan. Amigos vocês foram sensacionais. Muito Obrigado por tudo, principalmente nos almoços no bandeijão, nas disciplinas, ou no convívio no laboratório.

A todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia da esquistossomose e outras parasitoses (LIM/06) pelo auxílio técnico e por permitir que eu desenvolvesse meu trabalho com vocês. De forma muito especial, agradeço a Dra. Dirce Mary Correia Lima, pois além da convivência diária nesses quase dois anos de laboratório, sua ajuda nas reações e a palavra amiga, fizeram com que eu tivesse mais vontade de seguir em frente em minha carreira. Também agradeço à MSc. Clarice Lemos e à MSc. Maria Cristina Nakle por todo auxílio nas reações, sobretudo no empréstimo de materiais e equipamentos. Vocês foram fundamentais na obtenção dos meus resultados!

À Roseli Antonia Santo, secretária do programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, sua ajuda e principalmente suas informações foram fundamentais para eu chegar até aqui. Também agradeço as orientações para formatação deste trabalho feitas pela Suely Campos Cardoso e Valéria Vilhena.

A toda minha família por me aguentarem nesse período de mestrado, especialmente aos meus pais Heloisa e Mario Corral, à minha avó Lais Helena de Camargo Andreetta, à minha afilhada Anna Julia Bucciarelli Andreetta, à Maria de Fátima da Silva e ao meu primo Caio Andreeta Figueiredo.

A todos meus amigos pela paciência, carinho, amizade e por todo tipo de apoio que me deram durante essa jornada. Por sempre torcerem por mim e acompanharem mais uma etapa da minha vida. Especialmente Carolina Amie Degaki Haniuda e Camila Yoko Cintho as irmãs que escolhi ter na minha vida. Amigas, vocês foram meu alicerce durante esse período. Obrigado pelo apoio incondicional, vocês fizeram a diferença. Agradeço também o companheirismo do Renato Kaibara e do Fabio e Vinícius Moreti. Amo vocês!

A todos meus amigos da Graduação em Biomedicina da Universidade de Santo Amaro. Especialmente Ivan Henrique Yoshida, Juliana Ramos Gouveia e Melina Skelnick Sidi, formamos o melhor quarteto! E também à Alline Didone, Mônia Dias Rocha, Tamires Souza e Thiago Andrade Patente. Agradeço também às minhas queridas professoras e amigas Meire Cristina Pauleto, Carolina Beyrodt, Maria Regina Azevedo e Celidéia Coppi Vaz.

À Mariana Barros Missi, Juliane Tatiane Pimentel, Lucas Barros Missi, Marcio Everson Mecca e Catharina Preccaro Gomes de Brito, por toda ajuda prestada, principalmente para que meu exame de qualificação chegasse às mãos das minhas bancas!

Aos amigos do Instituto pela paciência e pela amizade que preservamos em todos os momentos, especialmente à Aline Pimentel Zanzeri, à Graziela Mendes Pereira, à Ingrid Dragan Taricano, à Alexandra Alves Nicolau, à Joseli Neves, à Adriana Almeida, ao Renato Xavier, ao Cesar Sato, à Andrea Cuesta e à Carolina de Souza Ruschi.

A todos os amigos professores, especialmente à Juliana Ferreira de Andrade, Leandro Marques Yoshizumi, Priscila Paruci, Luis Cachoni, Danieli Albertini,

Cristiane Lopes Federige, Simone Bragantini Camilo e Evaldo Moreira da Silva Junior. E também as alunas Bruna Cazoto de Camargo, Bruna Fecchio e Vanessa Alcântara Garcia.

À FAPESP por acreditar e conceder auxílio à pesquisa para que esse trabalho fosse realizado com sucesso.

"O estudo da gramática não faz poetas,
O estudo da harmonia não faz compositores,
O estudo da psicologia não faz pessoas equilibradas,
O estudo das "ciências da educação" não faz educadores,
Educadores não podem ser produzidos, Educadores nascem,
O que se pode fazer é ajudá-los a nascer,
Para isso eu falo e escrevo:
para que eles tenham coragem de nascer,"

Rubem Alves

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviatura, símbolos e siglas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	5
3 OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo geral	8
3.2 Objetivos específicos	8
4 REVISÃO DA LITERATURA	9
4.1 Aspectos gerais	10
4.2 Epidemiologia.....	11
4.3 Aspectos biológicos	13
4.4 Resposta imune	17
4.5 Patogenia e sintomas	19
4.6 Diagnóstico parasitológico	20
4.7 Sorologia	22
5 MÉTODOS	26
5.1 Aspectos éticos	27
5.1.1 Experimentação animal	27
5.1.2 Pesquisa com seres humanos	27
5.2 Obtenção dos parasitos	28
5.3 Obtenção das frações antigênicas	28
5.3.1 Frações alcalinas	29
5.3.2 Frações salinas PBS	29
5.3.3 Frações salinas Tris-HCl	30
5.4 População de estudo	30
5.5 Técnicas parasitológicas	32
5.5.1 Técnica de sedimentação espontânea	32
5.5.2 Técnica de cultura em placa de ágar	33

5.5.3 Técnica de termohidrotropismo larvário	33
5.6 Técnicas imunológicas	33
5.6.1 Teste imunoenzimático	33
5.6.2 <i>Western-blotting</i>	34
5.6.2.1 Análises do perfil eletroforético das amostras antigênicas	34
5.6.2.2 Imunodeteção de bandas antigênicas.....	35
5.7 Normas de biossegurança	36
5.8 Análise estatística	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Avaliação proteica das frações antigênicas	39
6.2 Técnicas parasitológicas	40
6.3 Técnicas sorológicas	41
6.3.1 Avaliação inicial da técnica ELISA	41
6.3.1.1 Técnica ELISA	43
6.3.2 <i>Western blotting</i>	48
7 DISCUSSÃO	61
8 CONCLUSÕES	71
9 ANEXOS	73
10 REFERÊNCIAS	81
Apêndices	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	14
Figura 2 – SDS-PAGE 12% indicando perfil proteico das frações solúveis SS, SA e ST e de membrana MS, MA e MT de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	40
Figura 3 – Curvas ROC, indicando o <i>cut-off</i> , a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) <i>likelihood ratio</i> segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0, utilizando a fração solúvel salina PBS (SS) de <i>S. venezuelensis</i> . As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses. A e B – soros diluídos 1:80 e o anticorpo secundário 1:60000 e 1:30000, respectivamente; C e D - 1:100 e 1:200, respectivamente e o anticorpo secundário 1:60000. E e F – soros 1:100 e 1:200, respectivamente e o anticorpo secundário 1:30000. G – soros 1:200 e anticorpo secundário 1:60000 bloqueados com PBSTM.....	42
Figura 4 – Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro com indivíduos com estrongiloidíase (grupo I (●)), com outras parasitoses (grupo II (▪)) e negativos (grupo III (▲)) por ELISA utilizando as frações solúveis de <i>S. venezuelensis</i> SS (A), SA (B) e ST (C). Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo.....	44
Figura 5 – Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro com indivíduos com estrongiloidíase (grupo I (●)), com outras parasitoses (grupo II (▪)) e negativos (grupo III (▲)) por ELISA utilizando as frações de membrana de <i>S. venezuelensis</i> MS (A), MA (B) e MT (C). Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo.....	45

Figura 6 - Curvas ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) *likelihood ratio* segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações solúveis SS (A), SA (B) e ST (C) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses..... 46

Figura 7 - Curvas ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) *likelihood ratio* segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações de membrana MS (A) , MA (B) e MT (C) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses..... 46

Figura 8 – Avaliação inicial do WB frente à preparação solúvel salina PBS (SS) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 e 2, grupo I), com ancilostomídeo (3, grupo II); e negativo (4, grupo III). Os soros e anticorpo secundário foram diluídos 1:1000. MM – Padrão de massa molecular de 220–12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)..... 49

Figura 9 – WB frente à preparação solúvel salina PBS (SS) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 50

Figura 10 – WB frente à preparação solúvel alcalina (SA) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 51

Figura 11 – WB frente à preparação solúvel salina Tris-HCl (ST) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 52

Figura 12 – WB frente à preparação de membrana salina PBS (MS) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 53

Figura 13 – WB frente à preparação de membrana alcalina (MA) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 54

Figura 14 – WB frente à preparação de membrana salina Tris-HCl (MT) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 55

Figura 15 - Porcentagem da frequência de reatividade das bandas frente a amostras de soro de indivíduos com *estrongiloidíase* (grupo I); com outras parasitoses (grupo II) ou negativos (grupo III) determinadas pela técnica de WB utilizando as frações solúveis SS (A), SA (B) e ST (C)..... 57

Figura 16 - Porcentagem da frequência de reatividade das bandas frente à amostras de soro de indivíduos com *estrongiloidíase* (grupo I); com outras parasitoses (grupo II) ou negativos (grupo III) determinadas pela técnica WB utilizando os extratos de membrana MS (A), MA (B) e MT (C)... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de proteínas das frações antigênicas obtidas a partir de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	39
Tabela 2 – Número de positivos por técnicas parasitológicas nas 92 amostras de fezes dos indivíduos do HCFMUSP de 2011 a 2013	41
Tabela 3 – Parâmetros de diagnóstico na validação da técnica de ELISA em diferentes concentrações do soro dos indivíduos e do conjugado.....	43
Tabela 4 – Parâmetros de diagnóstico das frações antigênicas de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> pela técnica de ELISA.....	47
Tabela 5 – Reatividade cruzada entre indivíduos com outras parasitoses (grupo II) nas diferentes frações antigênicas pela técnica ELISA	48
Tabela 6 – Parâmetros de diagnóstico das frações antigênicas de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> pela técnica de WB	59
Tabela 7 – Reatividade cruzada entre indivíduos com outras parasitoses (grupo II) nas diferentes frações antigênicas pela técnica WB	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
K	índice Kappa
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
AC	Acurácia diagnóstica
AUC	área sobre a curva
cm	centímetros
<i>Cut-off</i>	Frequência absoluta do corte
DAB	3,3'- Diaminobenzidina
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ES	Especificidade
<i>g</i>	giros
g	gramas
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio

HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-I	Vírus Linfotrópico Humano tipo I
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
INF- γ	Interferon gama
kDa	Kilodalton
L1-L2	Larvas rabditoides
L3	Larva filarioide infectante
L4	Larva adulta jovem
LR	<i>likelihood ratio</i>
M	Molar
mA	Miliamper
MA	Antígeno de membrana alcalino NaOH

mg	Miligramas
mL	mililitros
mm	milímetro
mM	Milimolar
MM	Padrão de Massa Molecular
MS	Antígeno de membrana salino PBS
MT	Antígeno de membrana salino Tris-HCl
N	Normal
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	nanômetros
OPD	Orto-fenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino
PBST	Tampão fosfato-salino acrescido de 0,05% tween 20
PBSTM	Tampão fosfato-salino 0,05% tween 20% com 3% de leite desnatado em pó
pH	potencial hidrogeniônico
PVDF	polyvinylidene difluoride
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>

Rpm	rotações por minuto
SA	Antígeno solúvel alcalino NaOH
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Sensibilidade
SS	Antígeno solúvel salino PBS
ST	Antígeno solúvel salino Tris-HCl
Th	Resposta T <i>helper</i>
TLRs	Receptores Toll-like (<i>Toll-like receptors</i>)
TM	Tampão de bloqueio (Tris-HCl 1M pH 7.5 5%, NaCl 5M 2% acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite desnatado em pó)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	2- amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
V	Volts
x	vezes
WB	<i>Western-blotting</i>

RESUMO

Corral MA. *Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana frente a diferentes frações antigênicas de Strongyloides venezuelensis*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A estrogiloidíase é a infecção parasitária causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*. O diagnóstico definitivo é realizado pela visualização de larvas, principalmente nas fezes. Porém as técnicas parasitológicas têm baixa sensibilidade. As técnicas sorológicas apresentam-se como importante alternativa diagnóstica. Pesquisas apontam para a utilização de antígenos heterólogos solúveis, principalmente de *Strongyloides venezuelensis*. A identificação e caracterização dos antígenos de membrana podem fornecer fonte alternativa de antígenos e assim auxiliar o desenvolvimento das técnicas imunológicas. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação das técnicas ELISA e WB frente a diferentes frações antigênicas de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Foram utilizadas amostras de sangue e fezes de 92 indivíduos, 20 indivíduos com estrogiloidíase (grupo I), 32 indivíduos com outras parasitoses (grupo II) e 40 indivíduos negativos (grupo III) pelos métodos de Lutz, cultura em placa de ágar e Rugai. Para preparação dos antígenos foram utilizadas larvas infectantes obtidas a partir de ratos infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Seis frações antigênicas foram preparadas: frações salinas solúveis e de membrana (PBS 0,01M pH 7,2 e SDS 1%, SS e MS; Tris-HCl 25mM pH 7,5 e CHAPS 1%, ST e MT, respectivamente) e frações alcalinas solúvel e de membrana (NaOH 0,15M e SDS 1%, SA e MA, respectivamente). Para a técnica ELISA foram utilizadas placas sensibilizadas com 10µg/mL de antígeno, soro dos indivíduos diluídos 1:200 em PBS 0,05% Tween 3% de leite (PBSTM) e o conjugado (anti IgG-humana peroxidase) em PBSTM. As amostras foram consideradas positivas quando o Índice ELISA foi maior que 1. Para a técnica de WB os soros foram diluídos 1:100 em Tris-HCl 5% de leite (TM) e o conjugado (anti IgG-humana peroxidase) em TM. Após as técnicas sorológicas foram determinadas os parâmetros de diagnóstico pela curva ROC como sensibilidade (SE), especificidade (ES), *Likelihood ratio* (LR) além da determinação da acurácia diagnóstica (AC) e do índice Kappa (K). A técnica ELISA destacou as frações de membrana com melhor desempenho em relação aos parâmetros diagnósticos estudados (SE 95%, ES 94,4%, AC 94,8%, LR 17,1, K 0,848). O WB revelou componentes antigênicos imunodominantes variando de 260-10kDa, mas destacam-se as frações de 40–35kDa mais frequentes em todas frações antigênicas. Pela técnica de WB, a fração ST apresentou melhor desempenho em relação aos parâmetros diagnósticos estudados (SE 100%, ES 93,1%, AC 94,5, LR 14,4, K 0,854). A utilização das frações de membrana no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana torna-se fonte acessível e eficaz em relação às frações purificadas, não necessitando de gastos complementares para sua obtenção.

Descritores: Estrogiloidíase; *Strongyloides venezuelensis*; Imunodiagnóstico; Antígenos de Helminths; Ensaio de imunoadsorção enzimática; Western blotting

SUMMARY

Corral MA. *Immunodiagnosis of human strongyloidiasis by different antigenic fractions of Strongyloides venezuelensis*. [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Strongyloidiasis is a parasitic infection caused by a nematode *Strongyloides stercoralis*. The definitive diagnosis is made by the larvae visualization in stool samples. However parasitological techniques have low sensitivity. Serological techniques became as suitable diagnostic alternative. Research indicates for the soluble heterologous antigen utilization, mainly *Strongyloides venezuelensis*. Identification and characterization of membrane antigen may constitute an alternative source of antigen and then assist the development of serological techniques. The aim of this study was evaluate ELISA and WB techniques behind different antigenic fractions of *S. venezuelensis* infective larvae. A total of 92 serum and stool samples was analyzed, 20 from individuals with strongyloidiasis (group 1), 32 with other parasitic diseases (group 2) and 40 from individuals with negative coproparasitology (group 3) using Lutz, agar plate culture and Rugai methods. For the antigen preparation infective larvae of *S. venezuelensis* from experimental infected rats were employed. Six antigenic fractions were prepared: saline soluble and from membrane fractions (0.01M PBS pH 7.2, and 1% SDS, SS and MS; 25mM Tris-HCl pH 7.5, 1% CHAPS, MT and ST, respectively) and alkaline soluble and membrane fractions (0.15 M NaOH and 1% SDS, SA and MA, respectively). For ELISA technique, plates were sensitized with 10 µg/mL of antigen, serum samples were diluted 1:200 in 0.05% Tween in PBS 3% milk (PBSTM) and conjugate (anti-human IgG peroxidase) in PBSTM. Positive samples were considered when ELISA index was greater than 1. To WB technique, serum samples were diluted 1:100 in Tris-HCl 5% milk (TM) and conjugate (anti-human IgG peroxidase) in the TM. After serological techniques diagnostics parameters were determined by ROC curve how sensitivity (SE), specificity (ES), Likelihood ratio (LR) and determination of diagnostic accuracy (AC) and Kappa (K) index. ELISA technique highlighted the membrane fractions with better performance compared to parameters diagnoses studied (95% SE, 94.4% ES, 94.8% AC, 17.1 LR, 0.848 K). The WB revealed immunodominant antigenic components ranging from 260-10kDa, but there are the fractions of 40-35kDa more frequent in all antigenic fractions. WB technique showed ST fraction better performance in relation to the diagnostic parameters (100% SE, 93.1% ES, 94.5% AC, 14.4 LR, 0.854 K). Membrane fractions in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis become an accessible and effective source of antigens in relation to the purified fractions, requiring no additional expense to obtain it.

Key-words: strongyloidiasis; *Strongyloides venezuelensis*; immunodiagnosis; antigens, Helminth; Enzyme-linked immunosorbent assay; Blotting, Western.

1 INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase é uma infecção parasitária causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*. Estima-se que de 30 a 100 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasito em todo o mundo (Olsen et al., 2009; WHO, 2014). No Brasil é uma doença negligenciada e sua ocorrência é estimada em 5,5% (Paula; Costa-Cruz, 2011; Requena-Méndez et al., 2013), caracterizando o país como região hiperendêmica.

Essa parasitose é frequentemente assintomática ou oligoassintomática. Em indivíduos imunocomprometidos, e também nos que usam corticosteroides, a doença pode assumir extrema gravidade levando a um quadro de hiperinfecção e/ou estrongiloidíase disseminada (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

O diagnóstico definitivo da estrongiloidíase ocorre pela visualização de larvas, principalmente nas fezes. Os métodos parasitológicos possuem baixa sensibilidade, uma vez que a liberação de larvas nas fezes é irregular e intermitente na maioria dos casos (Costa-Cruz et al., 2003). Dentre os métodos parasitológicos indicados para a pesquisa de larvas estão o de Baermann (1917) - Moraes (1948) e Rugai (1954) baseados no termo-hidrotropismo larvário. Porém, são necessárias diversas amostras de fezes coletadas em dias alternados para um resultado com sensibilidade apreciável (Uparanukraw et al., 1999). A cultura em placa de ágar (Arakaki et al., 1988; Koga et al., 1991) apresenta maior sensibilidade dentre os métodos parasitológicos, mas exige um tempo maior na obtenção dos resultados (Kobayashi et al., 1996; Hirata et al., 2007; Paula et al., 2013).

Os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade, sendo úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro nos casos de formas assintomáticas, no esclarecimento do diagnóstico clínico, no monitoramento de pacientes submetidos a tratamento anti-helmíntico e em inquéritos epidemiológicos (Costa-Cruz et al., 1997; Machado et al., 2001, 2003 ; Silva et al., 2003). Em geral, os testes sorológicos são de fácil execução (Van Doorn et al., 2007), além de não dependerem diretamente da eliminação de larvas.

As técnicas sorológicas possuem algumas limitações, tais como a obtenção de quantidades suficientes de antígenos de *S. stercoralis* para o fracionamento e análise, uma vez que o homem constitui a principal fonte de infecção do parasito e a manutenção do ciclo em modelo experimental é inviável. Outra limitação das técnicas sorológicas é o fenômeno de “reação cruzada”, com outros parasitos, como *Schistosoma mansoni* e ancilostomídeos, devido à grande complexidade antigênica que estes helmintos possuem (Conway et al., 1994; Grove, 1996; Costa-Cruz et al., 2003; Rodrigues et al., 2007).

Muitas pesquisas apontam para a utilização de antígenos heterólogos, ou seja, provenientes de outras espécies do gênero *Strongyloides* para o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana. Pesquisas focadas em espécies de roedores, *Strongyloides rattii* e *Strongyloides venezuelensis* apresentam resultados promissores, demonstrando altas sensibilidade e especificidade (Costa-Cruz et al., 1997; Machado et al., 2001, 2003; Silva et al., 2003; Rodrigues et al., 2004; Feliciano et al., 2010).

As preparações antigênicas de frações solúveis, de diferentes formas evolutivas do parasito como ovo, larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas, têm sido descritas (Northern; Grove, 1990; Gonçalves et al., 2012a; 2012b), embora o estágio evolutivo larvário seja o mais utilizado na padronização e na aplicação de técnicas imunológicas, sobretudo no ensaio imunoenzimático (ELISA) e no *Western-blotting* (WB).

2 JUSTIFICATIVA

É extremamente oportuna a rapidez no diagnóstico da estrongiloidíase para que o tratamento efetivo seja realizado precocemente, sobretudo no contexto das imunodepressões. Há, ainda, que se considerar a dificuldade na obtenção de amostras fecais, seja pela recusa na entrega da quantidade de amostras necessárias para análise, seja pelo mal acondicionamento, por serem diarreicas, por terem sido conservadas sob refrigeração ou ainda por terem sido submetidas a qualquer tipo de conservante, o que pode influir negativamente no resultado da técnica parasitológica para a pesquisa de larvas comprometendo, assim, a sua sensibilidade.

As técnicas parasitológicas mais sensíveis para o diagnóstico da estrongiloidíase, por sua vez, têm o inconveniente da demora em se obterem resultados consistentes. Por isso, o presente estudo, utilizando antígenos heterólogos, em razão da praticidade em sua obtenção, buscou analisar frações antigênicas solúveis e de membrana de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, para o aprimoramento do diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Implementar técnicas sorológicas para a aplicação no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, utilizando extratos antigênicos de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os extratos de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, através da eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Avaliar e aplicar os extratos solúveis e de membrana de larva filarioide de *S. venezuelensis* no diagnóstico da estrogiloidíase humana, utilizando a técnica ELISA;
- Identificar componentes antigênicos imunodominantes, pela técnica de *Western-blotting*, nos extratos solúveis e de membrana de larva filarioide de *S. venezuelensis*.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Aspectos gerais

Parasitos do gênero *Strongyloides* foram referidos pela primeira vez em soldados franceses com “diarreia da Conchinchina” (atual Vietnã) por Louis Alexis Normand. Foi então que o médico Arthur R. J. Bavay (1876) descreveu pequenos vermes nas fezes diarreicas e os denominou *Anguillula stercoralis*, sendo a anguilulose a respectiva doença. Em 1879, após a descoberta de diferentes formas evolutivas, Grassi os denominou *Strongyloides intestinalis* e posteriormente em 1902, após a descoberta do ciclo de vida livre e da forma parasitária, Stiles e Hassall os denominaram *Strongyloides stercoralis* (Grove, 1996).

No Brasil o parasito foi citado pela primeira vez por Ribeiro da Luz em 1880 e por Moraes em 1948, que revelaram a importância desse parasito como agente etiológico da estrongiloidíase (apud. Maia et al., 2006).

Após a reconstrução das árvores filogenéticas utilizando a análise do RNA ribossomal, admite-se serem pertencentes ao domínio Eucaryota, reino Metazoa, filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, superfamília Panagrolaimoidea, família Strongyloididae, gênero *Strongyloides*, com 52 espécies descritas. Podem parasitar aves, anfíbios, répteis e mamíferos como roedores, cães, gatos e o homem (NCBI, 2014).

Diversos autores citam o potencial antroponótico de algumas espécies de *Strongyloides*, dentre as quais há duas com potencial patogênico: *S. stercoralis* com distribuição mundial (Viney; Lok, 2007) e *S. fülleborni*, com ocorrência em primatas da África podendo, eventualmente, acometer o homem (Grove, 1996).

Há ainda relatos de infecções humanas por *S. procyonis* (Sato et al., 2006), *S. ransomi* (Grove, 1996) e *S. fülleborni kellyi* (Ashford et al., 1992; King; Mascie-Taylor, 2004).

4.2 Epidemiologia

Estima-se que 30 a 100 milhões de pessoas estejam infectadas com parasitos do gênero *Strongyloides* em todo o mundo, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais, com distribuição heterogênea. Stuerchler (1981) caracterizou em categorias a frequência do parasito no mundo, sendo esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (apud Pires; Dreyer, 1993).

Áreas endêmicas são encontradas na América Latina, África e Ásia. Alguns países da Europa como França, Suíça, Itália, Iugoslávia e Polônia apresentam casos esporádicos, bem como os Estados Unidos (região dos Apalaches e estados do sul), Japão (Okinawa) e Austrália.

No Brasil essa helmintíase é negligenciada e tem grande importância em Saúde Pública. A prevalência pode variar de acordo com a região e a população estudada, sendo que a maior ocorrência se dá nos estados de Alagoas, Amazonas, Mato Grosso, Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo (Paula; Costa-Cruz, 2011).

Paula e Costa-Cruz (2011) estimaram a ocorrência média de 3,9% de infectados na região Sudeste do país, sendo que os estados de Minas Gerais e

São Paulo se sobressaem sobre os demais. Em Minas Gerais, destacam-se os estudos de Machado e Costa-Cruz (1998) com 13% de positividade em escolares; e o de Machado et al., (2007) com 6,5% de positivos entre coletores de lixo. No estado de São Paulo, Rossi et al., (1993b) relataram 10,8% na região de Campinas e Miné e Rosa (2008) estudando populações da cidade de Araraquara detectaram 6,7% de casos positivos para *S. stercoralis*.

É difícil determinar a real prevalência da estrogiloidíase em uma população, uma vez que essa parasitose apresenta grande frequência de formas subclínicas crônicas, manifestações clínicas não específicas e com baixa sensibilidade na detecção do parasita pelas técnicas parasitológicas clássicas (Sudré et al., 2006). Diversos trabalhos, em muitas regiões do país, foram realizados determinando a presença de *S. stercoralis* em fezes de crianças e de adultos imunocomprometidos e imunocompetentes (Machado; Costa-Cruz, 1998; Muniz-Junqueira; Queiróz 2002; Fontes et al., 2003; Souza et al., 2007; Santos et al., 2007; Aguiar et al., 2007; Machado et al., 2007; Basso et al., 2008; Silva et al, 2009; Toledo et al., 2009).

Quando a população estudada é imunocomprometida, observa-se maior frequência de casos de estrogiloidíase em relação à população imunocompetente (Paula; Costa-Cruz, 2011). Paula et al., (2000) estudaram a estrogiloidíase em crianças imunodeprimidas reportando 3,31% de positividade. Em outro estudo, Blatt e Cantos (2003) realizaram a pesquisa de *S. stercoralis* em pacientes positivos e negativos para HIV, obtendo 10% e 5% de positividade, respectivamente. O estudo de Batista et al., (2011) em pacientes submetidos a transplantes em diferentes locais do Brasil, revelou

1,2% de estrongiloidíase intestinal. Além disso, Bounfrate et al., (2013) relataram a evolução para óbito de pacientes com estrongiloidíase grave associada ao uso de corticoides, transplantados, infectados por HTLV-1 e HIV.

4.3 Aspectos biológicos

O homem adquire a estrongiloidíase pela penetração ativa da larva infectante pela pele e/ou mucosas oral, esofágica ou gástrica, com auxílio da secreção de metaloproteases, que auxiliam na penetração e migração larvária (Gomes-Gallego et al., 2005; Park et al., 2010). As larvas alcançam os vasos sanguíneos, chegando aos pulmões, ultrapassam os capilares pulmonares e entram nos alvéolos diferenciando-se em L4. Após essa muda, as larvas atravessam a membrana alveolar e, através de migração pela árvore brônquica e traqueia, chegam à faringe, podendo ser expelidas por expectoração ou deglutidas, chegando às criptas da mucosa duodenal, principalmente nas glândulas de *Lieberkühn* e na porção superior do jejuno, onde atingem maturação final e se transformam em fêmeas partenogenéticas. Os ovos são depositados na mucosa intestinal onde eclodem liberando as larvas rabditoides (L1-L2), que alcançam a luz do intestino, podendo ser eliminadas com o material fecal (Liu; Weller, 1993; Pires; Dreyer, 1993; Grove, 1996).

Os parasitos do gênero *Strongyloides* possuem a característica de alternância entre duas gerações, uma de vida livre ou indireta com dimorfismo sexual e outra parasitária ou direta com a presença da fêmea parasita partenogenética. As fêmeas parasitas possuem carga genética $3n$ podendo

eliminar ovos n , $2n$ ou $3n$. Ovos com carga genética n resultarão em machos de vida livre, com a carga $2n$ em fêmeas de vida livre e $3n$ em novas fêmeas parasitas (Triantaphyllou; Moncol, 1977; Nemetschke et al., 2010).

No meio ambiente podem realizar dois ciclos, direto e indireto. No ciclo direto a larva rabditoide eliminada é $3n$; esta se desenvolverá em larva filarióide, que poderá penetrar ativamente na pele humana. No ciclo indireto as larvas rabditoides eliminadas são n ou $2n$; estas sofrerão quatro mudas no solo chegando a machos e fêmeas de vida livre, que copulam no solo e liberam ovos $3n$. As larvas rabditoides liberadas, se evoluírem em filariídes, poderão infectar o homem (Figura 1).

Fonte: Adaptado de CDC, 2013. www.dpd.cdc.gov

Figura 1 - Ciclo biológico de *S. stercoralis*

A persistência da infecção por longos períodos de tempo num hospedeiro é devida à capacidade peculiar do parasito em realizar auto-infecção, na qual a larva filarioide (L3) pode penetrar no intestino (auto-infecção interna) ou nas regiões perineal ou perianal (auto infecção externa) alcançando a circulação venosa e linfática, chegando nos pulmões e no coração e assim perpetuando o ciclo biológico sem novas exposições (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

Seis formas evolutivas são bem diferenciadas no ciclo biológico de *S. stercoralis*: ovo, larva rabditoide, larva filarioide, fêmea de vida livre, macho de vida livre e fêmea partenogenética (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

Os ovos são visualizados, sobretudo em pacientes sob uso de medicamentos laxativos, ainda assim, infrequentemente. Apresentam o mesmo formato dos ovos de ancilostomídeos, sendo elípticos, de parede fina e transparente, medindo aproximadamente 40 x 70 µm. Os ovos podem conter células embrionadas ou a larva rabditoide (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

A larva rabditoide é o principal estágio diagnóstico da estrogiloidíase, visualizada facilmente no sedimento fecal. Mede aproximadamente 210 µm e apresenta cutícula fina e hialina. A boca esta localizada próxima à cápsula bucal, o esôfago rabditoide é a estrutura interna mais proeminente, ocupando um terço de seu corpo e o intestino ocupa o restante do espaço. Apresentam primórdio genital nítido localizado no meio do corpo e sua cauda é pontiaguda. As características supracitadas as diferenciam das larvas de ancilostomídeos,

que possuem vestíbulo bucal longo e primórdio genital não visível (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

A larva infectante é também chamada de filarioide, devido ao seu esôfago cilíndrico e longo; apresenta vestíbulo bucal curto e o intestino termina em anus. É alongada, medindo de 350 a 500 μm e apresenta uma fina cutícula. Sua cauda é entalhada, ou seja, dividida em duas pontas o que a difere das larvas de ancilostomídeos, que apresentam cauda afilada. É nessa fase que a larva penetra na pele ou mucosa, e migra entre os órgãos e tecidos (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

A fêmea e o macho de vida livre ou estercoral podem ser encontrados no solo. A fêmea possui aspecto fusiforme com extremidade anterior arredondada e posterior afilada, medindo entre 800 e 1200 μm . Apresenta fina cutícula e aparelho digestivo simples com boca trilabiada, esôfago rabditoide e intestino. O sistema reprodutor é formado por útero anfidelfo, ovários, ovidutos e vulva. Já os machos de vida livre medem aproximadamente 700 μm e apresentam as mesmas características do sistema digestivo que as fêmeas. O aparelho genital é formado por testículo, vesícula seminal, canal deferente e canal ejaculador, que se abre na cloaca, localizada próxima aos espículos (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

A fêmea partenogenética possui o corpo cilíndrico com aspecto filiforme longo, com extremidade anterior mais larga que a posterior, mas ambas são finas, medindo cerca de 2000 μm . Apresenta aparelho digestivo simples com boca trilabiada, seu esôfago do tipo filarioide ocupa um quarto de seu

comprimento total, seguido de intestino simples e anus. O aparelho genital contém um útero anfidelfo, ovários, ovidutos e vulva, sendo considerada ovovivípara e não apresentando receptáculo seminal (Grove, 1996). Os ovos são alinhados em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário e são eliminados em número de 30 a 40 por dia (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

4.4 Resposta Imune

Para determinação do padrão imunológico frente à resposta a *Strongyloides* spp, infecções em modelos experimentais, sobretudo em ratos, vêm sendo realizadas. As espécies *S. ratti* e *S. venezuelensis* têm se consolidado como importante ferramenta para o estudo de antígenos heterólogos em testes imunológicos (Costa-Cruz et al., 2003; Silva et al., 2003; Gonçalves et al., 2012b) e em estudos sobre a modulação do sistema imune (Negrão-Corrêa et al., 2006; Machado et al., 2011; Tefé-Silva et al., 2012).

Tratando-se de um helminto, o padrão de resposta imunológica celular induzida é Th2, com a secreção de citocinas específicas (Mesquita Jr. et al., 2010). Destacam-se as interleucinas IL-3 (estimulação de basófilos), IL-4 (estimulação de basófilos e células B para produção de anticorpos IgE e IgG1, adesão e migração de eosinófilos através das membranas vasculares, promoção da contração da musculatura lisa, induzindo ao trânsito intestinal mais rápido), IL5 (atração e ativação de eosinófilos e a indução de IgA), IL-6 (estimulação de granulócitos e de células B e T), IL-10 e IL-13 (modulação negativa de resposta Th1) (Concha et al., 2005; Negrão-Corrêa et al., 2006).

Paralelamente à resposta T helper, os *Toll-like receptors* (TLRs) podem reconhecer os parasitos via *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) podendo estimular os macrófagos, que secretam moléculas pró-inflamatórias inespecíficas como $\text{TNF}\alpha$ e IL-1. Essas moléculas favorecem a proliferação das células caliciformes, provocando aumento na secreção de muco, visando a eliminação do parasito. Também haverá a produção de IL-12 e IL-18 induzindo a produção de $\text{INF}\gamma$ que favorece a proliferação e ativação de células Th1, modulando ou inibindo a resposta Th2 (Iriemenamm et al., 2010).

A resposta imune humoral contra *S. stercoralis* é caracterizada pela produção de anticorpos, sobretudo os da classe IgM, IgA e IgG específicos, além de IgE. Entre as subclasses da IgG destaca-se a participação da IgG4, havendo evidências que sinalizam a participação dessa imunoglobulina na cronicidade da doença e no estabelecimento das fêmeas parasitas (Genta; Lillibridge, 1989; Marcos et al., 2011). Rodrigues et al., (2007) relataram a participação da IgG1 e da IgE no mecanismo de resposta imune frente ao parasito. Rossi et al., (1993b) relataram que a IgG total é um bom marcador de diagnóstico sorológico, seguido da IgA e da IgE. Em casos crônicos com autoinfecção, o controle da imunidade ocorre pela presença das imunoglobulinas IgA, modulando a liberação larvária; IgE, regulando a autoinfecção e IgG4, podendo bloquear a ação da IgE (Marcos et al., 2011).

4.5 Patogenia e Sintomas

Aproximadamente 50% dos indivíduos infectados com *S. stercoralis* são assintomáticos. Quando há sintomas, estes são variáveis e provavelmente decorrentes da presença das formas evolutivas, sobretudo no intestino. Dor epigástrica, diarreia, náuseas, vômitos, constipação e perda de peso constituem as principais manifestações clínicas parasitárias (Concha et al., 2005).

A patogenia da estrogiloidíase é distinta nas diferentes fases do ciclo parasitário. Durante o ciclo pulmonar, pode ocorrer a Síndrome de Loeffler, na qual os eosinófilos se acumulam no tecido pulmonar em resposta à infecção parasitária. Na mucosa intestinal, haverá a presença das fêmeas parasitas, que desencadearão um processo inflamatório discreto (Grove, 1996; Gryscek; Siciliano, 2005).

A patogenia dessa helmintíase pode variar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro. Pacientes imunocompetentes seguem com a forma intestinal, constatando-se a presença da fêmea adulta parasita no trato gastrointestinal e liberação intermitente de larvas nas fezes. Em pacientes imunocomprometidos pode ocorrer a hiperinfecção, que consiste na aceleração do processo de autoinfecção e ecdise larvária, com aumento da quantidade de larvas em sítios habituais de migração, como trato gastrointestinal e pulmonar. Ainda, pode ocorrer a estrogiloidíase disseminada, podendo-se observar a invasão maciça sistêmica de larvas fora do trajeto de migração habitual, como cérebro e meninges. À hiperinfecção pode ou não suceder a infecção disseminada (Gryscek; Siciliano, 2005).

As causas mais frequentes de estrongiloidíase associada ao imunocomprometimento decorrem da desnutrição proteico-energética, alcoolismo, neoplasias hematológicas, diabetes com cetoacidose, terapia de imunossupressão com o uso de corticoides, transplantados de rim e fígado, e indivíduos infectados por HTLV-1 (Concha et al., 2005). Nestes casos a taxa de mortalidade decorrente da hiperinfecção ou estrongiloidíase disseminada é alta, podendo chegar a 87% (Olsen et al., 2009).

4.6 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico clínico da estrongiloidíase é difícil, pois trata-se de uma parasitose assintomática ou com sinais e sintomas inespecíficos, na maioria dos casos (Concha et al., 2005). Diante disso, há necessidade da realização do diagnóstico laboratorial, sobretudo com técnicas parasitológicas e sorológicas (Agrawal et al., 2009).

O diagnóstico padrão da estrongiloidíase é baseado na observação de formas do parasito, sobretudo os estágios de larvas rabditoide ou filarioide, principalmente nas fezes. Pacientes imunocompetentes apresentam baixa liberação de larvas, devido a intermitência em sua liberação o que dificulta o diagnóstico da parasitose (Uparanukraw et al., 1999). Formas parasitárias também podem ser encontradas em outros fluidos corporais como escarro, aspirado duodenal, líquido e material de biópsia nos casos de hiperinfecção ou infecção disseminada (Concha et al., 2005).

A probabilidade de encontrar uma larva de *S. stercoralis* em uma amostra única de fezes é de 25% (Segarra-Newnham, 2007). Para aumentar essa sensibilidade para 100% é recomendada a coleta de sete amostras, colhidas em dias alternados (Uparanukraw et al., 1999) além da utilização de técnicas de termohidrotropismo ou de cultura (Costa-Cruz et al., 2003; Concha et al., 2005).

As técnicas de Baermann (1917) - Moraes (1948) e Rugai (1954) têm por fundamento o termohidrotropismo positivo larvário. Entretanto, para que essas técnicas tenham sucesso, as larvas, se presentes, devem estar vivas em material fecal fresco não preservado. Na técnica de Baermann-Moraes o material fecal é colocado sobre uma gaze e tela, em seguida é colocado num funil conectado a um tubo de borracha fechado com uma pinça metálica, contendo água à temperatura de 45°C, apoiado em um suporte para deixar na posição vertical. Na técnica de Rugai o material fecal é vertido sob uma gaze em um cálice de sedimentação com água aquecida à mesma temperatura (De Carli, 2007).

As técnicas de enriquecimento como as de cultura em papel-filtro em tubo de ensaio, cultura de larvas em carvão e cultura em placa de ágar apresentam maior sensibilidade, quando comparadas com as técnicas de termohidrotropismo. Essas técnicas possibilitam a muda larvária e, com isso, a melhor visualização e identificação das formas evolutivas, mesmo que em baixas quantidades no material fecal (Liu; Weller, 1993; De Carli, 2007).

4.7 Sorologia

A técnica de ELISA, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o WB são descritos frequentemente como possíveis técnicas sorológicas para o diagnóstico da estrogiloidíase (Boscolo et al., 2007; Gonzaga et al., 2011b; Gonçalves et al., 2012b). Essas técnicas apresentam variadas sensibilidade e especificidade, de acordo com a preparação antigênica, o isotipo de anticorpo conjugado utilizados e a população estudada (Olsen et al., 2009).

As preparações antigênicas utilizadas nas técnicas de ELISA e WB inicialmente foram provenientes de antígenos homólogos de *S. stercoralis* (Conway et al., 1993; Siddiqui et al., 1997; Koosha et al., 2004; Sudré et al., 2006; Krolewiecki et al., 2010), mas diante da baixa carga parasitária em humanos e a inviabilidade de um modelo experimental que mantenha a cepa do parasito, recorre-se às preparações derivadas de antígeno heterólogo. São abundantes os relatos de pesquisadores que utilizaram *S. venezuelensis* e *S. ratti* para obtenção de antígenos heterólogos, uma vez que são de fácil obtenção, constituindo-se uma fonte segura de antígeno e não representam risco para seus manipuladores, além de apresentarem uma alta correlação com antígenos de *S. stercoralis* (Costa-Cruz et al., 1997; 2003; Machado et al., 2001; Rigo et al., 2008; Gonzaga et al., 2012).

Existem diversos métodos e tampões para obtenção de frações antigênicas. De acordo com o tampão de extração ocorre mudança na exposição de proteínas do parasito, havendo mudança no reconhecimento de bandas proteicas por anticorpos do paciente. De forma geral, as frações antigênicas utilizadas são solúveis e obtidas a partir da incubação das formas

evolutivas com tampão, homogeneização e centrifugação dos extratos. As preparações antigênicas mais utilizadas no imunodiagnóstico, são obtidas a partir do estágio larvário em tampão salino (Silva et al., 2003; Rodrigues et al., 2007) ou alcalino (NaOH) (Costa-Cruz et al., 2003; Machado et al., 2003, 2008).

Diversos trabalhos relataram a utilização do tampão salino nas preparações antigênicas com larvas filarioides de *S. stercoralis* como o de Genta e Lillibridge (1989) que utilizaram a técnica de WB identificando que soros dos pacientes positivos para *S. stercoralis* pelas técnicas parasitológicas, reconheceram a banda compreendida de 70-63kDa. Conway et al., (1993), com a mesma preparação antigênica, identificaram anticorpos contra as frações proteicas de 41, 31 e 28 kDa em pacientes com strongiloidíase. Siddiqui et al., (1997) identificaram as frações antigênicas de 96, 86, 75, 56, 41, 32, 28 e 26 kDa. Sudré et al., (2007) relataram bandas entre 129 e 6kDa, mas destacando a de 26kDa.

Em relação aos antígenos heterólogos de *S. ratti* destacam-se os trabalhos de Rodrigues et al., (2004) com a fração salina (PBS) encontrando bandas de 101 a 7 kDa, destacando as de 57 e 28kDa como imunodominante; e Silva et al., (2003) demonstraram a banda de 35 a 28 kDa com 96% de reconhecimento pelos soros de pacientes positivos para *S. stercoralis*. Quando se trata de antígenos heterólogos derivados de *S. venezuelensis*, Machado et al., (2008) demonstraram que a maioria dos soros de pacientes reconheceram a fração proteica de 45 kDa, utilizando o extrato solúvel alcalino. Gonzaga et al., (2011b) utilizando a fração salina (PBS) solúvel identificaram bandas de 120 a 160, 65 a 70, 52 a 55, 45, 41, 35 a 28, 21 e 19 kDa.

Existem estudos sobre as variações das frações antigênicas obtidas, nas quais os extratos podem ser tratados com algum detergente ou serem purificados. Feliciano et al., (2010) aplicaram a técnica de ELISA utilizando diversas variações antigênicas de larvas de *S. venezuelensis* empregando o tampão salino e alcalino, observando que a fração detergente (Triton X114) salina foi mais eficiente no diagnóstico da estrongiloidíase humana. Gonzaga et al., (2011a) purificaram o antígeno salino em uma coluna de Concanavalina-A e demonstraram nesse estudo que a fração não ligante se revelou melhor para os testes sorológicos. Por outro lado, Gonzaga et al., (2012) relataram a fração ligante do antígeno salino de *S. venezuelensis* em resina de troca iônica de dietilaminoetil cefarose como provável fonte de polipetídeos imunodominantes. Inês et al., (2013) relataram a utilização de metaperiodato de sódio na fração solúvel salina.

Paralelamente à purificação de proteínas, Northern et al., (1989) descreveram, de forma pioneira, que proteínas de membrana de parasitos constituem importante fonte antigênica e a sua caracterização pode ser realizada com o uso de detergentes. Os detergentes frequentemente utilizados em laboratórios são surfactantes suaves, ou seja, agentes que atuam na superfície, podendo promover o rompimento de membranas celulares e, assim, liberar as proteínas (Bollag et al., 1996).

Dentre os detergentes mais utilizados, pode-se destacar o SDS (iônico) e o CHAPS (zwiteriônicos). Detergentes iônicos são hidrofóbicos e apresentam um componente aniônico ou catiônico. O SDS é um surfactante eficaz que consegue solubilizar a maioria das proteínas em uma solução, quebrando

ligações não covalentes de proteínas levando à desnaturação, perda da conformação nativa e da função. É amplamente utilizado na eletroforese de géis de poliacrilamida em condições desnaturantes. O grupo dos detergentes zwitteriônicos (ou anfóteros) é hidrofílico e contém tanto carga positiva quanto negativa, em quantidades iguais, resultando numa carga zero, normalmente mais forte que os surfactantes não iônicos (Linke, 2009).

Existem também estudos com antígenos recombinantes como o de Ravi et al.,(2002) que obtiveram 87,5% de sensibilidade e 94,0% de especificidade para a técnica de ELISA. Pela técnica de WB a banda imunodominante foi a de 38kDa, seguidas das de 31 e 42 kDa. Krolewiecki et al.,(2010) demonstraram 84% de sensibilidade e 100% de especificidade para um antígeno recombinante de 31 kDa, mas destacaram a utilização do ensaio com luciferase com 97,8% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Outros estágios evolutivos têm sido avaliados para a aplicação nas técnicas sorológicas. Paralelamente à utilização larvária em preparações antigênicas, Gonçalves et al., (2012a; 2012b) utilizaram antígenos de ovos e fêmeas partenogênicas para o imunodiagnóstico; entretanto, o antígeno larvário continuou a se destacar dos demais.

Têm sido relatadas outras formas de extração de proteínas de parasitos utilizadas como antígenos com possíveis aplicações em técnicas sorológicas. Castro-Borges et al., (2007) relataram a utilização de tampão Tris-HCl para extração de proteínas solúveis de *Schistosoma mansoni*. Para estrogiloidíase, Northen e Grove (1990) e Paula et al., (2009) utilizaram o tampão supracitado para extração de proteínas.

5 MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

5.1.1 Experimentação animal

Os projetos experimentais de pesquisa cumprem as Leis 6.638/79 e 9605/98, o Decreto 24.645/34, os princípios éticos na Experimentação Animal (COBEA) e outras instruções que regulamentam pesquisas com animais. Os trabalhos foram iniciados após aprovação do projeto de pesquisa número CEP-IMT 002/10, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP), São Paulo, Brasil.

5.1.2 Pesquisa com seres humanos

De acordo com as normas que regem as pesquisas que envolvam seres humanos, foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) que obedece às recomendações da Resolução número 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde. O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, posteriormente, ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado sob número 266.046 (Apêndice B).

5.2 Obtenção dos Parasitos

Para manutenção do ciclo do parasito, *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, mantidos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) foram infectados experimentalmente, a intervalos de 15 dias, via subcutânea, com 2000 larvas filarioides de *S. venezuelensis*. A cepa mantida foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, docente do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As larvas filarioides foram obtidas a partir de cultura das fezes de ratos infectados após o décimo dia da infecção. Aproximadamente 20 gramas de fezes foram diluídas em água e acrescidas de carvão animal, a cultura permaneceu em estufa (28°C) por 48 horas. As larvas filarioides foram colhidas e concentradas utilizando a técnica de Rugai. As larvas recolhidas foram contadas sob microscopia óptica, em seguida lavadas com solução salina e mantidas a -20°C até o momento do uso.

5.3 Obtenção das frações antigênicas

As preparações antigênicas foram realizadas a partir de larvas filarioides, sendo que essas foram diluídas em solução alcalina (NaOH) ou tampão salino (PBS e Tris-HCl). Foram testadas as frações solúveis e de membrana de cada preparação. O conteúdo proteico das frações foi avaliado utilizando-se o método de Lowry et al., (1951), com soro albumina bovina para

a construção da curva padrão e o kit comercial da Bio-Rad [®] (Hercules,CA,USA).

5.3.1 Frações alcalinas

As frações alcalinas em NaOH (antígeno solúvel alcalino (SA) e antígeno de membrana alcalino de larvas filarioides (MA)) foram adaptadas de Machado et al., (2003). Aproximadamente 100 mg de larvas filarioides, foram ressuspensas em tampão de homogeneização 0,15M NaOH (1,0mL), suplementado com coquetel de inibidores de protease (50 μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As frações solúveis foram obtidas por sonicação, homogeneização e centrifugação 12400g a 4°C durante 30 minutos. Os *pellets* obtidos foram utilizados para a extração de proteínas de membrana através de homogeneização em tampão SDS 10% (1,0mL) por 5 minutos a 100°C, seguido de centrifugação 12400g a 4°C.

5.3.2 Frações Salinas PBS

As frações salinas em PBS (antígeno solúvel salino PBS de larvas filarioides (SS), antígeno de membrana salino de larvas filarioides (MS)) foram adaptadas de Gonzaga et al., (2011b). Aproximadamente 100 mg de larvas filarioides, foram ressuspensas em tampão de homogeneização PBS 0,01M pH 7,2 (1,0mL) suplementado com coquetel de inibidores de protease (50 μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As frações solúveis foram obtidas por sonicação e centrifugação 12400g a 4°C durante 30 minutos. Os *pellets* obtidos

foram utilizados para a extração de proteínas de membrana através de homogeneização em tampão SDS 10% (1,0mL) por 5 minutos a 100°C, seguido de centrifugação 12400g a 4°C.

5.3.3 Frações Salinas Tris-HCl

As frações salinas Tris-HCl (antígeno solúvel salino (ST), antígeno de membrana salino de larvas filarioides (MT)) foram adaptadas de Castro-Borges et al., (2007). Aproximadamente 100 mg de larvas filarioides foram ressuspensas em tampão de homogeneização 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 1% glicerol (1,0mL) suplementado com coquetel de inibidores de protease (50µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As frações solúveis foram obtidas por sonicação, seguida de ultra-centrifugação a 12400g a 4 °C durante 60 minutos. Os *pellets* obtidos foram utilizados para a extração de proteínas de membrana através de homogeneização em tampão 7M ureia, 2M tiourea, 4% CHAPS, 65 mM DTT (1,0mL) por 5 minutos a 100°C, seguido de centrifugação 12400g a 4°C.

5.4 Populações de estudo

Foram utilizadas 92 amostras de sangue e de fezes de indivíduos que tinham acompanhamento ambulatorial no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo e voluntários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, divididas em três grupos baseando-

se nos resultados parasitológicos das amostras de fezes. O critério de inclusão à pesquisa constituiu-se do fornecimento de amostras de fezes e sangue e o de exclusão a idade inferior a 10 anos. Os indivíduos foram divididos em três grupos:

Grupo I: 20 pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *S. stercoralis*;

Grupo II: 32 pacientes com diagnóstico parasitológico para outras parasitoses intestinais monoinfectados: Ancilostomídeos (n=4); *Ascaris lumbricoides* (n=2); *Blastocystis* spp (n=3); *Enterobius vermicularis* (n=1); *Endolimax nana* (n=3); *Giardia intestinalis* (n=3) ; *Hymenolepis nana* (n=1); *Schistosoma mansoni* (n=9); ou polinfectados: ancilostomídeos, *H. nana* (n=1); *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis* spp, *E. nana* (n=1); *G. intestinalis*, *E. nana* (n=1); *A. lumbricoides*, *Blastocystis* spp (n=1); *Endolimax nana*, *S. mansoni*, *Blastocystis* spp (n=1); ancilostomídeos, *E. coli*, *Entamoeba dispar/histolytica*; *S. mansoni* (n=1).

Grupo III: 40 indivíduos com diagnóstico parasitológico negativo para quaisquer enteroparasitos.

Os indivíduos dos grupos I e II foram recrutados a partir do diagnóstico parasitológico conduzido na Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com métodos de rotina (Lutz, Rugai, Faust e coloração pelo Tricrômio) em amostras de fezes. O recrutamento se deu por contato

telefônico, pelo qual se solicitou nova amostra de fezes. Na consulta médica, o indivíduo foi informado sobre a pesquisa e convidado a participar do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi realizada a coleta de uma amostra de sangue, por punção venosa, antes do tratamento.

O grupo III foi formado por voluntários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Foram solicitadas amostras de fezes e sangue, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. De acordo com o resultado coproparasitológico os indivíduos foram direcionados aos grupos I, II ou III.

As amostras de fezes foram processadas imediatamente após a coleta pelos métodos de sedimentação, cultura em placa de ágar e Rugai enquanto que a amostra de sangue foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos para a separação do soro permanecendo estocado a -20°C até o momento do uso.

5.5 Técnicas Parasitológicas

5.5.1 Técnica de Sedimentação espontânea (Lutz, 1919)

Aproximadamente 5g de fezes foram diluídos em 50 mL de água; a seguir foram acrescentados aproximadamente 100 mL de água filtrada, que foram filtrados em gaze, permanecendo em repouso, por aproximadamente duas horas. O sedimento formado, acrescido de Lugol, foi analisado em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x.

5.5.2 Técnica de cultura em placa de ágar (Koga et al., 1991)

Aproximadamente 2g de fezes foram adicionadas a uma placa de Petri contendo ágar motilidade para realização da cultura. A placa foi vedada e deixada a temperatura ambiente por dois dias. Após o período supracitado, a placa foi embebida em álcool 70% por 10 minutos. O material foi coletado, centrifugado, acrescido de Lugol e analisado em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x.

5.5.3 Técnica de termohidrotropismo larvário (Rugai, 1954)

O restante do material fecal permaneceu no frasco coletor, foi recoberto com gaze. O conjunto foi vertido em um cálice contendo água corrente aquecida a aproximadamente 40°C por duas horas. O material sedimentado foi coletado, acrescido de Lugol e analisado em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x.

5.6 Técnicas Imunológicas

5.6.1 Técnica Imunoenzimática (ELISA)

Inicialmente foi realizada uma avaliação da técnica de ELISA utilizando o extrato SS como antígeno, soros diluídos 1:80, 1:100 e 1:200, e o conjugado diluído 1:30000 e 1:60000 em PBST (PBS com 0,05% de Tween 20, pH 7,2) e

PBSTM (PBST com leite desnatado em pó 3%). Esta avaliação foi realizada buscando a obtenção de melhores resultados de especificidade e sensibilidade.

Após a avaliação inicial, foi estabelecido que a técnica de ELISA fosse executada nas seguintes condições: as placas de poliestireno foram sensibilizadas durante a noite com 10µg/ml das diferentes frações antigênicas estudadas, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. Após lavagem com PBST, foram adicionados os soros padrões negativos e positivos, bem como soros-testes diluídos em PBSTM. Após 45 minutos a 37°C, nova lavagem com PBST. Em seguida, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano fração fc marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), diluído em PBSTM. Após 45 minutos a 37°C, foi adicionado o substrato H₂O₂, OPD (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5, na ausência da luz por 15 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N. Os valores de absorbância foram determinados em leitor de ELISA (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) no comprimento de onda de 490nm.

5.6.2 Western-blotting (WB)

5.6.2.1 Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas

Para determinar o perfil de bandas procedeu-se à análise eletroforética com a realização da técnica de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio). Aproximadamente 20µg/mL por cm de gel das

frações antigênicas foram submetidos a eletroforese em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

O gel de poliacrilamida de 12% foi preparado em suporte vertical para mini-gel (SCIE-PLAS, LTD, Cambridge, EN). As amostras foram ressuspensas em quantidade igual de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, DTT 0,1M, Azul de bromofenol 0,2%) e aquecidas a 100°C em banho-maria por cinco minutos e pipetadas no gel. Após a adição do tampão de corrida Tris (0,3%) – Glicina (1,5%) procedeu-se a eletroforese a 100V e 40mA por aproximadamente duas horas. Foi utilizado padrão de massa molecular (10 a 260kDa - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) para determinação das bandas proteicas relativas.

O gel foi corado com *Coomassie blue* 0,5% e digitalizado para documentação. Massas moleculares das frações proteicas foram determinadas por regressão linear, de acordo com o padrão de massa molecular referência.

5.6.2.2 Imunodeteção de bandas proteicas

Para determinar o perfil de bandas proteicas reconhecidas pelos soros positivos para *S. stercoralis*, após a SDS-PAGE, foi realizado o WB. Membranas de PVDF (20µm) (Bio-Rad Laboratories Headquarter, Hercules, CA, USA) foram utilizadas para a transferência em sistema Mini Trans-blot.

O sistema de eletrotransferência foi executado com a utilização de esponja, papéis filtro, gel, membrana, novamente papéis filtro e esponja, formando um sanduíche, umedecidos em tampão de transferência (Tris 10mM,

Glicina 95mM, etanol 20%, SDS 10%). A amperagem foi de 200mA e a voltagem 50V por aproximadamente 2 horas. As membranas foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm e estocadas até o momento do uso.

Para estabelecer as condições ideais de reação de WB, foi realizada uma avaliação inicial com antígeno SS, soros em diferentes diluições 1:100 e 1:1000; e o anticorpo secundário anti-IgG humano fração Fc conjugado à peroxidase, diluído 1:500, 1:1000 e 1:2000 em tampão Tris-HCl Leite 5% (TM).

Após a avaliação inicial, a membrana foi colocada para reagir com o anticorpo primário (soros testes) diluído 1:100 em tampão de diluição (TM - Tris-HCl 1M pH 7,5 5%, NaCl 5M 2% acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite desnatado em pó) por um período de aproximadamente 18 horas a 4°C, após bloqueio em tampão Tris-HCl 1M pH 7,5 acrescido de 3% de Tween 20 e 3% de Leite por 1h a 4°C. O anticorpo secundário (anti-IgG humana fração Fc conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído 1:1000 no tampão de diluição do anticorpo por 1h30. A revelação foi realizada com DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) comercial na ausência de luz.

A detecção de componentes antigênicos deu-se com auxílio do scanner Luminescent image analyser (Fujifilm, Minato, Tóquio, JP) e do programa Image Quant LAS 400 versão 1.2 (GE, Fairfield, CT, USA).

5.7 Normas de Biossegurança

Os procedimento de coleta, manipulação de materiais biológicos e reagentes, além da utilização de equipamentos, estiveram em conformidade com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al., (2005).

5.8 Análise estatística

A análise dos antígenos nos diferentes grupos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis utilizando comparações não paramétricas de Dumm (Neter et al., 1996; Kirkwood; Sterne, 2006).

A determinação dos valores de corte para cada antígeno foi elaborada a partir da análise da curva *receiver operating characteristic* (ROC) e medidas de diagnóstico, $p < 0,05$ (Programa STATA 11.0) (Greinerj et al., 1995).

Os resultados da reatividade dos soros estão expressos em índice ELISA (IE) – valores de absorbância dividido pelo *cut-off* (média acrescida de dois desvios padrões de soros padrões negativos), sendo consideradas positivas as amostras com $IE > 1,0$.

Para técnica de WB foram considerados indivíduos positivos aqueles que apresentaram no mínimo duas bandas, dentre as frequentes em mais de 50% dos indivíduos do grupo I.

Para mensurar a eficiência, a concordância das técnicas diagnósticas e a razão de probabilidade foram calculados, respectivamente, a acurácia diagnóstica (AC), soma dos pacientes verdadeiros positivos com os verdadeiros negativos divididos pelo número total de pacientes; o índice Kappa (K) correlacionando a acurácia encontrada com a esperada; e o *Likelihood ratio* (LR), que relaciona a sensibilidade com a probabilidade de indivíduos sem a doença serem positivos laboratorialmente (Mineo et al., 2005).

6 RESULTADOS

Os resultados referentes à avaliação proteica das frações antigênicas bem como da aplicação das técnicas parasitológicas e das técnicas sorológicas aos três grupos de indivíduos estão apresentadas a seguir.

6.1 Avaliação proteica das frações antigênicas

Após a obtenção das frações antigênicas, uma alíquota foi destinada para dosagem proteica pelo método de Lowry et al., (1951) (Tabela 1) e outra destinada à análise por SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes, para observação do perfil de bandas (Figura 2).

Tabela 1 – Concentração de proteínas das frações antigênicas obtidas a partir de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

Fração antigênica	Proteínas (mg/mL)
SS – solúvel PBS	1,3
SA – solúvel alcalino	7,2
ST – solúvel Tris-HCl	1,8
MS – membrana PBS	6,2
MA – membrana alcalino	1,7
MT – membrana Tris-HCl	6,9

Figura 2 – SDS-PAGE 12% indicando perfil proteico das frações solúveis SS, SA e ST e de membrana MS, MA e MT de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

6.2 Técnicas Parasitológicas

As amostras de fezes foram processadas pelos métodos de Lutz, Rugai e cultura em placa de ágar. De acordo com os resultados obtidos, os indivíduos foram divididos nos grupos I, II e III. A técnica de cultura em placa de ágar revelou 95% de positividade para *S. stercoralis* (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de positivos pelas técnicas parasitológicas nas 92 amostras de fezes dos indivíduos do HCFMUSP de 2011 a 2013

Grupos	Cultura			Total
	Lutz	em placa de ágar	Rugai	
Grupo I	8	19	11	20
Grupo II	30	4*	1*	32
Grupo III	0	0	0	40

*amostras positivas para ancilostomídeos.

6.3 Técnicas Sorológicas

6.3.1 Avaliação inicial da técnica ELISA

A avaliação inicial foi realizada com antígeno SS, em função de ser o mais estudado. Os soros foram diluídos 1:80, 1:100 e 1:200 em PBST e PBSTM e o anticorpo secundário 1:30000 e 1:60000 em PBST e PBSTM.

Os dados foram analisados utilizando a curva ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), a área sob a curva (AUC) e o *likelihood ratio* (LR). De acordo com a análise da curva ROC (Figura 3), os resultados iniciais demonstraram sensibilidade de 76,5% a 100%, e especificidade de 40% a 87,5% (Tabela 3).

Figura 3 – Curvas ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) *likelihood ratio* segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0, utilizando a fração solúvel salina PBS (SS) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses. A e B – soros diluídos 1:80 e o anticorpo secundário 1:60000 e 1:30000, respectivamente; C e D - 1:100 e 1:200, respectivamente e o anticorpo secundário 1:60000. E e F – soros 1:100 e 1:200, respectivamente e o anticorpo secundário 1:30000. G – soros 1:200 e anticorpo secundário 1:60000 bloqueados com PBSTM

Tabela 3 – Parâmetros de diagnóstico na validação da técnica de ELISA em diferentes concentrações do soro dos indivíduos e do conjugado

	Soro	Conjugado	SE (%)	ES (%)
A*	1:80	1:30000	100	45
B*	1:80	1:60000	100	40
C*	1:100	1:60000	87,5	46,5
D*	1:200	1:60000	100	46,7
E*	1:100	1:30000	93,3	42,3
F*	1:200	1:30000	78,6	40,7
G**	1:200	1:60000	76,5	87,6

A e B – soros diluídos 1:80 e o anticorpo secundário 1:30000 e 1:60000, respectivamente; C e D - 1:100 e 1:200, respectivamente e o anticorpo secundário 1:60000. E e F – soros 1:100 e 1:200, respectivamente e o anticorpo secundário 1:30000. G – soros 1:200 e anticorpo secundário 1:60000 bloqueados com PBSTM.; *Soros diluídos em PBST; ** Soros diluídos em PBSTM; SE – Sensibilidade; ES – Especificidade.

6.3.1.1 Técnica ELISA

A partir dessa avaliação inicial, os soros dos indivíduos dos grupos I, II e III foram diluídos em tampão PBSTM 1:200 e o anticorpo secundário anti-IgG humano, foi diluído 1:30000 em PBSTM. Para a avaliação dos dados gerados pela curva ROC, foi calculada a acurácia, definida como a soma dos pacientes verdadeiros positivos com os verdadeiros negativos divididos pelo número total de pacientes.

Os soros dos indivíduos foram testados com antígenos solúveis e de membrana pela técnica de ELISA, como demonstrado nas Figuras 4 e 5, respectivamente. A análise dos dados utilizando a curva ROC, demonstrou que

as frações solúveis dos antígenos apresentaram sensibilidade de 90,0% e especificidade de 88,9% a 94,4% (Figura 6), enquanto que as frações de membrana 95,0% e 94,4%, de sensibilidade e especificidade, respectivamente (Figura 7). A sensibilidade, a especificidade, a acurácia e o índice Kappa de cada fração antigênica estão apresentados na Tabela 4. Os resultados de reatividade cruzada para técnica ELISA estão demonstrados na Tabela 5.

Figura 4 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro com indivíduos com estrongiloidíase (grupo I (●)), com outras parasitoses (grupo II (•)) e negativos (grupo III (▲)) por ELISA utilizando as frações solúveis de *S. venezuelensis* SS (A), SA (B) e ST (C). Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo

Figura 5 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro com indivíduos com estrongiloidíase (grupo I (●)), com outras parasitoses (grupo II (▪)) e negativos (grupo III (▲)) por ELISA utilizando as frações de membrana de *S. venezuelensis* MS (A), MA (B) e MT (C). Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo

Figura 6 - Curvas ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) *likelihood ratio* segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações solúveis SS (A), SA (B) e ST (C) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses

Figura 7 - Curvas ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) *likelihood ratio* segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando as frações de membrana MS (A), MA (B) e MT (C) de *S. venezuelensis*. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses

Tabela 4 - Parâmetros de diagnóstico das frações antigênicas de larvas filarioides de *S. venezuelensis* pela técnica de ELISA

Frações antigênicas	SE (%)	ES (%)	AC (%)	κ
SS	90,0	88,9	89,2	0,712
SA	90,0	94,4	93,5	0,815
ST	90,0	88,9	89,2	0,712
MS	95,0	94,4	94,8	0,848
MA	95,0	94,4	94,8	0,848
MT	95,0	94,4	94,8	0,848

SE – Sensibilidade; ES – Especificidade; AC – Acurácia Diagnóstica; K – índice Kappa

Tabela 5 – Reatividade cruzada entre indivíduos com outras parasitoses (grupo II) nas diferentes frações antigênicas pela técnica ELISA

Parasitos	SS	SA	ST	MS	MA	MT
<i>S. mansoni</i> (n=9)	1	2	2	1	1	1
<i>A. lumbricoides</i> (n=2)	-	-	-	-	-	-
Ancilostomídeos (n=4)	1	1	1	-	-	-
<i>E. vermicularis</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-
<i>G. lamblia</i> (n=3)	-	-	-	-	-	-
<i>E. nana</i> (n=3)	-	-	-	-	-	-
<i>Blastocystis</i> spp (n=3)	-	-	-	-	-	-
<i>H. nana</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-
Poli infectados * (n=6)	-	-	1	-	1	-

* ancilostomídeos, *H. nana* (n=1); *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis* spp, *E. nana* (n=1); *G. intestinalis*, *E. nana* (n=1); *A. lumbricoides*, *Blastocystis* spp (n=1); *Endolimax nana*, *S. mansoni*, *Blastocystis* spp (n=1); ancilostomídeos, *E. coli*, *Entamoeba dispar/histolytica*; *S. mansoni* (n=1).

6.3.2 Western-blotting

Para estabelecer as condições ideais para a reação de WB, foi realizada a avaliação inicial, utilizando a fração SS como antígeno, soros nas diluições 1:100 e 1:1000; e o anticorpo, diluído 1:500; 1:1000 e 1:2000 em tampão Tris-HCl Leite 5% (TM). A Figura 7 demonstra a avaliação inicial realizada com o soro e o anticorpo diluídos 1:1000 em tampão TM. Após essa avaliação estabeleceu-se que os soros fossem diluídos 1:100 *overnight* e o anticorpo secundário 1:1000 em tampão TM. Nas Figuras 8 a 13 estão demonstrados WB das diferentes frações antigênicas de *S. venezuelensis*.

Figura 8 – Avaliação inicial do WB frente à preparação solúvel salina PBS (SS) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 e 2, grupo I), com ancilostomídeo (3, grupo II); e negativo (4, grupo III). Os soros e anticorpo secundário foram diluídos 1:1000. MM – Padrão de massa molecular de 220–12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Figura 9 – WB frente à preparação solúvel salina PBS (SS) de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Figura 10 – WB frente à preparação solúvel alcalina (SA) de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Figura 11 – WB frente à preparação solúvel salina Tris-HCl (ST) de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Figura 12 – WB frente à preparação de membrana salina PBS (MS) de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Figura 13 – WB frente à preparação de membrana alcalina (MA) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Figura 14 – WB frente à preparação de membrana salina Tris-HCl (MT) de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 5, grupo I); com outras parasitoses (6 a 10, grupo II); e negativos (11 a 15, grupo III). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Foram considerados componentes antigênicos imunodominantes aqueles com frequência maior ou igual a 50% nos pacientes no grupo I. Os testes foram considerados positivos quando apresentaram duas ou mais bandas imunodominantes. A frequência de todas as bandas encontradas pela técnica de WB consta no Anexo A, e as bandas imunodominantes utilizando os antígenos solúveis e de membrana estão demonstrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Após análise chegou-se aos dados de sensibilidade e especificidade da técnica de WB. As frações solúveis apresentaram sensibilidade variando de 90% a 100% e especificidade de 84,7% a 93,1%. As frações de membrana apresentaram sensibilidade de 100% e especificidade variando de 54,2% a 93,1% (Tabela 6). Os resultados de reatividade cruzada do teste WB estão demonstrados na Tabela 7.

Figura 15 - Porcentagem da frequência de reatividade das bandas frente às amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo I); com outras parasitoses (grupo II) ou negativos (grupo III), determinadas pela técnica de WB utilizando as frações solúveis, SS (A), SA (B) e ST (C)

Figura 16 - Porcentagem da frequência de reatividade das bandas frente às amostras de soro de indivíduos com estrongiloidíase (grupo I); com outras parasitoses (grupo II) ou negativos (grupo III) determinadas, pela técnica de WB utilizando os extratos de membrana, MS (A), MA (B) e MT (C)

Tabela 6 – Parâmetros de diagnóstico das frações antigênicas de larvas filarioides de *S. venezuelensis* pela técnica de WB

Parâmetros	SE (%)	ES (%)	AC (%)	LR	K
SS	90	93,1	92,4	13	0,788
SA	100	84,7	88	6,6	0,707
ST	100	93,1	94,5	14,4	0,854
MS	100	93,1	92,4	10,3	0,801
MA	100	54,2	64,1	2,2	0,339
MT	100	84,7	88,0	6,6	0,707

SE – Sensibilidade; ES – Especificidade; AC – Acurácia Diagnóstica; LR – *Likelihood ratio*; K – índice Kappa

Tabela 7 – Reatividade cruzada entre indivíduos com outras parasitoses (grupo II) nas diferentes frações antigênicas pela técnica de WB

Parasitos	SS	SA	ST	MS	MA	MT
<i>S. mansoni</i> (n=9)	-	1	-	1	1	1
<i>A. lumbricoides</i> (n=2)	-	-	-	-	-	-
Ancilostomídeos (n=4)	-	-	-	2	1	1
<i>E. vermicularis</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-
<i>G. lamblia</i> (n=3)	-	-	-	-	2	-
<i>E. nana</i> (n=3)	-	-	-	-	-	-
<i>Blastocystis</i> spp (n=3)	-	-	-	1	-	-
<i>H. nana</i> (n=1)	-	-	-		-	-
Poli infectados * (n=6)	-	-	-	3	-	2

* ancilostomídeos, *H. nana* (n=1); *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis* spp, *E. nana* (n=1); *G. intestinalis*, *E. nana* (n=1); *A. lumbricoides*, *Blastocystis* spp (n=1); *Endolimax nana*, *S. mansoni*, *Blastocystis* spp (n=1); ancilostomídeos, *E. coli*, *Entamoeba dispar/histolytica*; *S. mansoni* (n=1)

7 DISCUSSÃO

A estrogiloidíase é uma infecção parasitária negligenciada, com prevalência em regiões tropicais e subtropicais, sobretudo no Brasil (Paula; Costa-Cruz, 2011). O diagnóstico dessa parasitose é realizado, principalmente, pelas técnicas parasitológicas. Entretanto estas apresentam baixa sensibilidade, principalmente pela intermitência na liberação larvária e pouca eliminação de larvas nos casos crônicos (Uparanukraw et al., 1999; Zaha et al., 2000).

No presente trabalho, os testes parasitológicos foram realizados para definição dos grupos de estudo, sendo o grupo I indivíduos com resultado positivo para *S. stercoralis*, em pelo menos uma técnica parasitológica. O diagnóstico parasitológico confirmou a maior sensibilidade na placa de ágar, apresentando sensibilidade de 95%. Inês et al., (2011), revelaram a mesma porcentagem na técnica supracitada para a detecção de *S. stercoralis*.

As técnicas sorológicas vêm sendo utilizadas como alternativas no diagnóstico desta parasitose, sobretudo associadas às técnicas parasitológicas, visto que a detecção de casos positivos aumenta quando ambos os exames são realizados concomitantemente (Machado et al., 2008). Entre as técnicas sorológicas destacam-se as técnicas de ELISA e de WB (Pirisi et al., 2006; Requena-Méndez et al., 2013).

Diversos trabalhos foram realizados buscando as melhores condições de sensibilidade e de especificidade para o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase (Ravi et al., 2002; Costa-Cruz et al., 2003; Machado et al., 2003, Inês et al., 2013).

A utilização dos antígenos heterólogos de *S. venezuelensis* ou de *S. ratti* vem sendo relatada por diversos autores como alternativa para o

imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana. O uso dos antígenos heterólogos se faz tão eficiente quanto ao homólogo com índices de sensibilidade e especificidade semelhantes (Costa-Cruz et al., 2003; Rodrigues et al., 2007; Van Doorn et al., 2007; Gonçalves et al., 2012b). No presente trabalho, foram utilizadas como antígeno larvas filarioides de *S. venezuelensis*, diante de sua disponibilidade e ênfase dada atualmente na literatura (Machado et al., 2008; Feliciano et al., 2010; Gonzaga et al., 2011a; 2011b; 2012; Gonçalves et al., 2012a; 2012b).

Em relação aos diferentes estágios evolutivos do parasito utilizados como antígenos no imunodiagnóstico, tem sido observada predominância na utilização de larvas filarioides (Conway et al., 1993; 1994; Silva et al., 2003; Koosha et al., 2004; Mota-Ferreira et al., 2009; Sultana et al., 2012; Inês et al., 2013). No entanto, estágios diferentes do parasito podem apresentar componentes antigênicos específicos, podendo levar ao reconhecimento de anticorpos específicos do paciente. Northen e Grove (1990) revelaram o potencial antigênico dos estágios de fêmeas partenogênicas e larvas filarioides. Gonçalves et al., (2012a; 2012b) descreveram os estágios de ovo, de larva filarioide e de fêmea partenogênica como fonte de antígeno para o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase, mas apontam o antígeno de larva com maior sensibilidade e especificidade, em relação aos demais. Devido à maior disponibilidade e rendimento na obtenção de antígenos, utilizou-se aqui apenas a forma evolutiva de larvas filarioides. Dentre as frações analisadas a fração solúvel alcalina (SA) apresentou maior rendimento proteico e a fração solúvel salina PBS (SS) o menor.

De modo geral existe uma grande preocupação com as preparações antigênicas empregadas nos testes, principalmente na avaliação de tampões para a extração de proteínas, constituindo etapa fundamental na obtenção de antígenos (Feliciano et al., 2010). Para a obtenção de proteínas, destaca-se a rapidez para evitar a desnaturação. Alterações nas preparações antigênicas para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase vêm sendo realizadas visando obter-se melhores resultados de sensibilidade e especificidade das reações (Ribeiro et al., 2010; Gonzaga et al., 2011a; 2011b; 2012; Inês et al., 2013).

O tampão mais utilizado na extração de frações antigênicas solúveis é o tampão fosfato (PBS) (Rossi et al., 1993b; Conway et al., 1994; Siddiqui et al., 1997; Costa-Cruz et al., 2003; Koosha et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Van Doorn et al., 2007; Mota-Ferreira et al., 2009; Gonzaga et al., 2012; Inês et al., 2013). Este é o principal e mais abundante tampão encontrado em laboratórios, utilizado em diferentes procedimentos e com característica de manter o pH fisiológico. A solução alcalina NaOH também tem sido utilizada (Machado et al., 2003; Gonçalves et al., 2012a; 2012b), uma vez que seu pH extremo, pode permitir a liberação de frações proteicas importantes para a preparação de antígenos. Neste estudo, foi utilizado tanto o tampão salino como a solução alcalina nas preparações antigênicas (SS e MS; SA e MA, respectivamente).

O tampão Tris-HCl foi utilizado na tentativa de identificação de bandas de *S. stercoralis* por Northen e Grove (1990) através de WB em uma e duas dimensões, e por Paula et al., (2009), que o utilizaram na obtenção de proteínas para estudo do complexo proteolítico-proteassoma de *S. venezuelensis*. Neste

trabalho utilizou-se esse mesmo tampão na obtenção de frações antigênicas de *S. venezuelensis* para aplicação nas técnicas ELISA e WB.

Optou-se, para o presente estudo, pela utilização das frações de membrana nas técnicas sorológicas, uma vez que estas frações podem ser consideradas fonte alternativa de antígenos. Rossi et al., (1993a) sugeriram um melhor aproveitamento da extração proteica ressuspendendo o *pellet* em ureia e Tris-HCl, mas sem quaisquer detergentes. Northern et al., (1989) relataram a utilização de detergentes para identificação de proteínas da cutícula de *S. ratti*. Braschi et al., (2006) confirmaram a presença de proteínas de membrana e de citoesqueleto no *pellet*, enquanto que as proteínas citosólicas foram encontradas no sobrenadante. Diante destes relatos, as frações de membrana utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do tratamento dos *pellets* com detergentes, originados após a obtenção das frações solúveis.

A análise do perfil eletroforético das frações antigênicas revelou bandas de massa molecular semelhantes, variando de 150 a 15kDa. Entretanto as mais evidentes foram as frações de 120, 65 e 47kDa nas frações de membrana e na SA. Gonçalves et al., (2012b) determinaram bandas com valores inferiores variando de 90 a 15kDa, com o antígeno solúvel alcalino. Já, Feliciano et al., (2010) detectaram bandas de 131 a 35kDa com o antígeno solúvel salino e de 95 a 55kDa com o antígeno solúvel alcalino. Não há na literatura, menção à utilização de frações de membrana para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase.

Para as técnicas ELISA e WB foram utilizadas frações antigênicas distintas, salinas e alcalinas. A avaliação inicial foi realizada com o antígeno SS, por ser a

fração mais estudada (Koosha et al., 2004; Sudré et al., 2007; Van Doorn et al., 2007; Gonzaga et al., 2011a; 2011b). Em relação a técnica ELISA, seguindo as condições apresentadas na literatura (Machado et al., 2007; Rodrigues et al., 2007), para a população em estudo não foram obtidos bons resultados, sendo necessária uma reavaliação para determinar condições ideais de reação, uma vez que à análise da curva ROC haviam valores de especificidade muito baixos (entre 40 a 46,7%).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que as frações antigênicas solúveis apresentaram menor sensibilidade (90%) que as frações de membrana (95%). A especificidade das frações salinas ST e SS (88,9%) foram menores que as demais (94,4%).

Resultados de sensibilidade e especificidade utilizando a fração solúvel salina têm sido descritas na literatura com valores variáveis. Ravi et al., (2002) utilizando antígeno recombinante de *S. stercoralis* e Gonzaga et al., (2011a) com antígeno de *S. venezuelensis*, obtiveram sensibilidades inferiores às encontradas no presente trabalho. Silva et al., (2003) utilizando *S. ratti* e Feliciano et al., (2010) e Gonzaga et al., (2011a) com *S. venezuelensis*, obtiveram os mesmos valores. Já, Krolewiecki et al., (2010), com antígeno de *S. stercoralis*, conseguiu sensibilidade superior (97%). Em relação à especificidade, apenas o trabalho de Gonzaga et al., (2011a) obteve valor inferior, visto que os demais autores citados obtiveram valores variando de 90% a 100%.

Dos trabalhos que utilizam a fração solúvel alcalina para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase, os valores de sensibilidade variaram de

92,5% a 100%, todos superiores aos do presente estudo (Machado et al., 2003; 2008; Feliciano et al., 2010; Gonçalves et al., 2012a; 2012b). Em relação à especificidade, os valores relatados na literatura variaram de 93,8% a 100% (Machado et al., 2003; 2008; Gonçalves et al., 2012a; 2012b) e apenas o estudo de Feliciano et al., (2010) apresentou resultado inferior ao encontrado aqui.

Os dados de especificidade das reações podem ter sido comprometidos, pois apenas uma amostra fecal foi analisada para definição dos grupos II e III. Uparanukraw et al., (1999) sugerem o processamento de sete amostras para um resultado parasitológico seguro. Além disso, existe a possibilidade de reatividade cruzada com indivíduos do grupo II, sobretudo os infectados com ancilostomídeos e *S. mansoni*, fato este já relatado na literatura (Conway et al., 1993; Schaffel et al., 2001; Siddiqui; Berk, 2001; Olsen et al., 2009; Bon et al., 2010; Requena-Méndez et al., 2013).

As frações de membrana apresentaram valores de *likelihood ratio* (LR) superior a 10,0. Jaechke et al., (1994) propuseram que valores acima de 10,0 podem confirmar o diagnóstico da doença. Desta forma entre as frações solúveis apenas a SA possui LR nessas condições, enquanto que as frações de membrana, todas possuem LR maior que 10,0. Utilizando o mesmo padrão de análise com a fração antigênica SS, Gonzaga et al., (2012) obtiveram valores inferiores (LR=6,2) e Gonzaga et al., (2011a) superiores (LR=9,0).

O índice Kappa (K) expressa a confiabilidade de um teste em relação à taxa geral de concordância. Mineo et al., (2005) propõem que quando $0,60 < K < 0,80$ a concordância deve ser classificada como boa e quando $0,80 < K < 1,00$,

como excelente. Assim, neste estudo, as frações salinas SS e ST ($K = 0,712$) apresentaram boa concordância e as frações SA ($K = 0,815$), MS, MA e MT ($K = 0,848$) excelente concordância.

A técnica de WB tem sido utilizada no imunodiagnóstico da estrogiloidíase, com alta especificidade e sensibilidade no reconhecimento de componentes antigênicos de *S. stercoralis* ou de espécies heterólogas por anticorpos presentes no soro de indivíduos com estrogiloidíase (Conway et al., 1994; Silva et al., 2003).

A determinação de bandas pelo WB foi mais evidente com a menor diluição dos soros e maior período de incubação. Diferentes condições de reação de WB têm sido mencionadas na literatura, utilizando antígeno heterólogo (Silva et al., 2003; Gonzaga et al., 2011b) e utilizando antígeno homólogo (Siddiqui et al., 1997; Sudré et al., 2007), demonstrando a necessidade de padronização das técnicas sorológicas *in house*, principalmente na escolha do método de extração das frações proteicas.

Diversos componentes antigênicos imunodominantes foram encontrados nas diferentes frações antigênicas, sendo que esses variaram de 10 a 260kDa para SS, SA, ST, MS, MA e MT. O reconhecimento dos componentes antigênicos classificados como imunodominantes presentes no grupo I, revelou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

A fração de 40-35kDa foi mais frequente dentre todas as frações (SS= 80%; SA = 100%; ST= 100%; MS = 95%; MA = 65%; MT = 90%). Independentemente da preparação utilizada para a produção de antígenos,

resultados similares foram relatados por autores que utilizaram antígeno heterólogo de *S. venezuelensis* como a banda de 45 kDa (Machado et al., 2008) e as frações de 35-28kDa (Gonzaga et al., 2011b). As mesmas frações também foram demonstradas por Silva et al., (2003) utilizando como antígeno *S. ratti*. Siddiqui et al., (1997), utilizando antígeno homólogo identificaram a fração de 41kDa como imunogênica. A fração descrita no presente estudo provavelmente é equivalente àquela identificada pelos autores citados, uma vez que algumas diferenças como mudanças de pH e alteração de temperatura na preparação dos antígenos podem promover variações.

Somente o trabalho de Northern et al., (1989) identificou possíveis proteínas de membrana, demonstrando as frações de 56-42kDa encontradas na cutícula de *S. ratti*. Nas frações antigênicas de membrana do presente trabalho, somente a MT determinou a banda semelhante, possivelmente pela forma semelhante de extração de proteínas.

As frações de 260-140kDa foram relatadas pela primeira vez neste estudo. Porém, indivíduos com outras parasitoses e negativos (grupos II e III, respectivamente) também as reconheceram; portanto não podem ser consideradas indicadoras de positividade.

A fração 28-26kDa é frequentemente relatada em testes com antígenos solúveis homólogos (Conway et al., 1993; Siddiqui et al., 1997; Sudré et al., 2007) e heterólogos (Silva et al., 2003; Rodrigues et al., 2004; Feliciano et al., 2010). Essa fração foi encontrada nas preparações antigênicas ST (70%), MA (50%) e MT (50%). Já as frações 17-14kDa foram frequentes nas preparações antigênicas

SS (70%), SA (65%), ST (85%), MS (85%) e MT (95%) e relatadas também por Rodrigues et al., (2004) e Sudré et al., (2007). As frações de 58-71kDa foram encontradas nas preparações antigênicas SS (65%), SA (60%) e MS (75%) e somente Rodrigues et al., (2004), Gonzaga et al., (2011b) e Siddiqui et al., (1997) relataram a sua ocorrência.

A reatividade cruzada foi maior quando as frações de membrana foram utilizadas, sobretudo na preparação de MA, apresentando menores valores de especificidade. A fração solúvel ST e a fração de membrana MS apresentaram maiores valores de sensibilidade (100% para ambas) e de especificidade (93,1%). O diagnóstico poderia ser confirmado utilizando as frações ST, SS e MS, pois as mesmas apresentam LR maior que 10,0 (14,4; 13,0 e 10,3, respectivamente). O índice Kappa foi considerado excelente nas frações ST e MS (0,854 e 0,801, respectivamente), bom em SS, MT e SA (0,707, 0,707 e 0,788, respectivamente) e regular em MA (0,339).

Diante da dificuldade de obtenção de antígenos para o imunodiagnóstico da strongiloidiase humana, o presente trabalho propõe a utilização de frações antigênicas que anteriormente eram descartadas. Rossi et al., (1993a) destacaram a possibilidade de maior rendimento de antígeno homólogo através de um segundo processo de extração com ureia, abrindo perspectivas para o fracionamento do extrato bruto do parasito na tentativa de encontrar frações com maior atividade antigênica específica e menor reatividade cruzada. Com isso, as frações de membrana constituem-se uma fonte de antígeno tão acessível e eficaz quanto as purificadas, não demandando custos adicionais para sua obtenção.

8 CONCLUSÕES

- As frações de membrana apresentaram melhor desempenho em relação aos parâmetros diagnósticos estudados, na técnica ELISA.
- A fração ST apresentou melhor desempenho em relação aos parâmetros diagnósticos estudados, na técnica WB.
- As frações de membrana podem auxiliar o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, podendo ser consideradas fonte alternativa de antígeno.

9 ANEXOS

Anexo A- Tabelas contendo dados da frequência reativa de bandas por antígeno

Banda	Grupos						Total		P
	I		II		III				
	N	%	N	%	N	%	n	%	
SS 260 a 240	12	60,0	0	0,0	11	27,5	23	25,0	<0,001
SS 230	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001
SS 210	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
SS 190	13	65,0	0	0,0	0	0,0	13	14,1	<0,001
SS 160 a 150	7	35,0	10	31,3	14	35,0	31	33,7	0,936
SS 123	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
SS 110	13	65,0	0	0,0	2	5,0	15	16,3	<0,001
SS 100	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
SS 85	1	5,0	0	0,0	0	0,0	1	1,1	0,213
SS 81	0	0,0	0	0,0	3	7,5	3	3,3	0,077
SS 71 a 68	8	40,0	0	0,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
SS 65	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
SS 60 a 58	13	65,0	0	0,0	0	0,0	13	14,1	<0,001
SS 55 a 53	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
SS 52 a 51	0	0,0	0	0,0	7	17,5	7	7,6	0,002
SS 49	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SS 43	0	0,0	0	0,0	5	12,5	5	5,4	0,013
SS 42 a 41	7	35,0	0	0,0	0	0,0	7	7,6	<0,001
SS 40 a 37	16	80,0	0	0,0	11	27,5	27	29,3	<0,001
SS 35 a 34	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
SS 31 a 29	6	30,0	1	3,1	0	0,0	7	7,6	<0,001
SS 25	7	35,0	0	0,0	0	0,0	7	7,6	<0,001
SS 21 a 22	10	50,0	2	6,3	0	0,0	12	13,0	<0,001
SS 20 a 19	8	40,0	0	0,0	7	17,5	15	16,3	<0,001
SS 15	14	70,0	1	3,1	6	15,0	21	22,8	<0,001
SS 12	9	45,0	0	0,0	0	0,0	9	9,8	<0,001

Banda	Grupos								P
	I		II		III		Total		
	N	%	n	%	N	%	n	%	
SA 260 a 220	16	80,0	1	3,1	31	77,5	48	52,2	<0,001
SA 210	0	0,0	1	3,1	1	2,5	2	2,2	0,601
SA 204	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 202	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 197	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 193	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 191	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 190	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 189	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 176	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 175 a 160	18	90,0	1	3,1	3	7,5	22	23,9	<0,001
SA 155	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 150	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
SA 145	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
SA 143	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 133	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 130	7	35,0	0	0,0	0	0,0	7	7,6	<0,001
SA 120	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001
SA 114	0	0,0	0	0,0	6	15,0	6	6,5	0,005
SA 109	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 108	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
SA 107	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 103 a 95	9	45,0	1	3,1	2	5,0	12	13,0	<0,001
SA 94	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
SA 90 a 85	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
SA 84	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 76	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 75	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 70	12	60,0	0	0,0	1	2,5	13	14,1	<0,001
SA 66	11	55,0	0	0,0	0	0,0	11	12,0	<0,001
SA 65	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 64	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 62	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 61	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
SA 59	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
SA 58	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 56	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 52	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 49	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
SA 44	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 43	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
SA 39 a 36	20	100,0	0	0,0	5	12,5	25	27,2	<0,001
SA 34	9	45,0	0	0,0	0	0,0	9	9,8	<0,001
SA 31	9	45,0	0	0,0	0	0,0	9	9,8	<0,001
SA 26	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
SA 23 a 20	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
SA 17	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
SA 16	8	40,0	0	0,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
SA 15	13	65,0	0	0,0	0	0,0	13	14,1	<0,001

SA 14	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
SA 12	4	20,0	0	0,0	1	2,5	5	5,4	0,009

Banda	Grupos								P
	I		II		III		Total		
	N	%	n	%	N	%	n	%	
ST 260	20	100,0	0	0,0	0	0,0	20	21,7	<0,001
ST 190	0	0,0	5	15,6	30	75,0	35	38,0	<0,001
ST 170	0	0,0	10	31,3	10	25,0	20	21,7	0,003
ST 140	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
ST 120	8	40,0	0	0,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
ST 100 a 98	16	80,0	0	0,0	2	5,0	18	19,6	<0,001
ST 70	4	20,0	0	0,0	3	7,5	7	7,6	0,017
ST 57	3	15,0	0	0,0	0	0,0	3	3,3	0,009
ST 53 a 49	17	85,0	2	6,3	3	7,5	22	23,9	<0,001
ST 38	0	0,0	0	0,0	3	7,5	3	3,3	0,077
ST 37	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
ST 35	20	100,0	0	0,0	7	17,5	27	29,3	<0,001
ST 28	14	70,0	0	0,0	4	10,0	18	19,6	<0,001
ST 27	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
ST 23 a 20	18	90,0	0	0,0	0	0,0	18	19,6	<0,001
ST 18	0	0,0	0	0,0	5	12,5	5	5,4	0,013
ST 15	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
ST 14	17	85,0	0	0,0	0	0,0	17	18,5	<0,001

Banda	Grupos						Total	P	
	I		II		III				
	N	%	n	%	n	%			
MS 250	0	0,0	0	0,0	4	10,0	4	4,3	0,032
MS 195	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MS 190	0	0,0	3	9,4	0	0,0	3	3,3	0,038
MS 181	0	0,0	7	21,9	0	0,0	7	7,6	<0,001
MS 162	0	0,0	3	9,4	0	0,0	3	3,3	0,038
MS 154	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MS 150	3	15,0	0	0,0	2	5,0	5	5,4	0,048
MS 147	0	0,0	8	25,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
MS 135	0	0,0	2	6,3	1	2,5	3	3,3	0,346
MS 126	0	0,0	5	15,6	0	0,0	5	5,4	0,004
MS 110	14	70,0	2	6,3	0	0,0	16	17,4	<0,001
MS 107	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
MS 105	0	0,0	6	18,8	0	0,0	6	6,5	0,001
MS 101	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MS 93	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
MS 87	0	0,0	2	6,3	0	0,0	2	2,2	0,116
MS 85	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
MS 79	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
MS 71	15	75,0	3	9,4	0	0,0	18	19,6	<0,001
MS 66	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MS 61	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MS 60	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
MS 55	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
MS 49	7	35,0	7	21,9	9	22,5	23	25,0	0,523
MS 43	0	0,0	0	0,0	2	5,0	2	2,2	0,184
MS 42	3	15,0	0	0,0	0	0,0	3	3,3	0,009
MS 40	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MS 38	19	95,0	11	34,4	0	0,0	30	32,6	<0,001
MS 35	15	75,0	0	0,0	0	0,0	15	16,3	<0,001
MS 31	9	45,0	10	31,3	0	0,0	19	20,7	<0,001
MS 28	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
MS 26	0	0,0	3	9,4	0	0,0	3	3,3	0,038
MS 21	13	65,0	3	9,4	1	2,5	17	18,5	<0,001
MS 15	17	85,0	5	15,6	1	2,5	23	25,0	<0,001
MS 12	16	80,0	3	9,4	1	2,5	20	21,7	<0,001
MS 10	15	75,0	0	0,0	0	0,0	15	16,3	<0,001

Banda	Grupos						Total		P
	I		II		III				
	N	%	n	%	N	%	n	%	
MA 250 a 220	20	100,0	0	0,0	0	0,0	20	21,7	<0,001
MA 230 a 208	0	0,0	0	0,0	17	42,5	17	18,5	<0,001
MA 200	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001
MA 180 a 170	9	45,0	5	15,6	14	35,0	28	30,4	0,050
MA 150 a 143	4	20,0	4	12,5	9	22,5	17	18,5	0,529
MA 142	2	10,0	0	0,0	0	0,0	2	2,2	0,044
MA 138 a 132	5	25,0	7	21,9	0	0,0	12	13,0	0,001
MA 130 a 120	4	20,0	0	0,0	14	35,0	18	19,6	<0,001
MA 119 a 116	0	0,0	8	25,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
MA 112	0	0,0	0	0,0	15	37,5	15	16,3	<0,001
MA 110	8	40,0	0	0,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
MA 109 a 92	0	0,0	13	40,6	0	0,0	13	14,1	<0,001
MA 101	0	0,0	0	0,0	6	15,0	6	6,5	0,005
MA 100	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
MA 92	2	10,0	0	0,0	0	0,0	2	2,2	0,044
MA 78	0	0,0	0	0,0	5	12,5	5	5,4	0,013
MA 77	3	15,0	0	0,0	0	0,0	3	3,3	0,009
MA 69	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
MA 66	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001
MA 62	0	0,0	0	0,0	6	15,0	6	6,5	0,005
MA 59	0	0,0	0	0,0	4	10,0	4	4,3	0,032
MA 52	0	0,0	0	0,0	14	35,0	14	15,2	<0,001
MA 50	4	20,0	6	18,8	0	0,0	10	10,9	0,002
MA 48	0	0,0	13	40,6	0	0,0	13	14,1	<0,001
MA 47	0	0,0	0	0,0	18	45,0	18	19,6	<0,001
MA 46	3	15,0	1	3,1	0	0,0	4	4,3	0,029
MA 45	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
MA 43	0	0,0	1	3,1	22	55,0	23	25,0	<0,001
MA 41	5	25,0	1	3,1	24	60,0	30	32,6	<0,001
MA 40	0	0,0	2	6,3	0	0,0	2	2,2	0,116
MA 39	13	65,0	6	18,8	27	67,5	46	50,0	<0,001
MA 38	0	0,0	2	6,3	0	0,0	2	2,2	0,116
MA 37 a 36	12	60,0	0	0,0	32	80,0	44	47,8	<0,001
MA 35	0	0,0	3	9,4	18	45,0	21	22,8	<0,001
MA 33	5	25,0	0	0,0	15	37,5	20	21,7	<0,001
MA 30	0	0,0	0	0,0	6	15,0	6	6,5	0,005
MA 29	10	50,0	0	0,0	0	0,0	10	10,9	<0,001
MA 26	0	0,0	4	12,5	0	0,0	4	4,3	0,012
MA 25	0	0,0	0	0,0	8	20,0	8	8,7	0,001
MA 23 a 20	10	50,0	4	12,5	8	20,0	22	23,9	0,009
MA 19	0	0,0	3	9,4	0	0,0	3	3,3	0,038
MA 18	0	0,0	0	0,0	1	2,5	1	1,1	0,432
MA 17	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001
MA 16	0	0,0	3	9,4	0	0,0	3	3,3	0,038
MA 15	0	0,0	0	0,0	12	30,0	12	13,0	<0,001
MA 12	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001

Banda	Grupos						Total	P	
	I		II		III				
	N	%	N	%	N	%			
MT 200 a 190	0	0,0	14	43,8	2	5,0	16	17,4	<0,001
MT 150 a 140	11	55,0	10	31,3	9	22,5	30	32,6	0,044
MT 120	6	30,0	0	0,0	6	15,0	12	13,0	0,002
MT 110	16	80,0	3	9,4	0	0,0	19	20,7	<0,001
MT 100 a 90	8	40,0	0	0,0	7	17,5	15	16,3	<0,001
MT 78	0	0,0	4	12,5	0	0,0	4	4,3	0,012
MT 77	0	0,0	0	0,0	4	10,0	4	4,3	0,032
MT 74 a 67	8	40,0	0	0,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
MT 58	6	30,0	6	18,8	4	10,0	16	17,4	0,158
MT 54	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
MT 53	0	0,0	0	0,0	4	10,0	4	4,3	0,032
MT 50 a 49	16	80,0	2	6,3	0	0,0	18	19,6	<0,001
MT 44	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
MT 40 a 35	0	0,0	4	12,5	10	25,0	14	15,2	0,009
MT 38 a 37	18	90,0	0	0,0	0	0,0	18	19,6	<0,001
MT 35	15	75,0	0	0,0	0	0,0	15	16,3	<0,001
MT 30	0	0,0	7	21,9	0	0,0	7	7,6	<0,001
MT 29	0	0,0	0	0,0	13	32,5	13	14,1	<0,001
MT 28	10	50,0	0	0,0	0	0,0	10	10,9	<0,001
MT 25	0	0,0	1	3,1	0	0,0	1	1,1	0,344
MT 23 a 20	13	65,0	1	3,1	0	0,0	14	15,2	<0,001
MT 17	7	35,0	0	0,0	0	0,0	7	7,6	<0,001
MT 15	19	95,0	2	6,3	2	5,0	23	25,0	<0,001
MT 12	12	60,0	0	0,0	0	0,0	12	13,0	<0,001

10 REFERÊNCIAS

Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal UC. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103:242-6.

Aguiar JIA, Gonçalves AQ, Sodré FC, Pereira SR, Bóia MN, Lemos ERS, Daher RR. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007;40:631–4.

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*. 1988;16:11–7.

Ashford RW, Barnish G, Viney ME. *Strongyloides fuelleborni kellyi*: infection and disease in Papua New Guinea. *Parasitology Today*. 1992;8(9):314-8.

Baermann G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel Mit h. Geneesk. *Laboratories Weltvreden Feestbundel*. 1917,41-7.

Basso RMC, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BCA. Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41:263–8.

Batista MV, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girão ES, Rosa DR, Ianhez LE, Bonazzi PR, Lima AS, Fernandes PF, Pádua-Neto MV, Bacchella T, Oliveira AP, Viana CF, Ferreira MS, Shikanai-Yasuda MA. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Tropical Medicine and International Health*. 2011;16(9):1134-42.

Blatt JM, Cantos GA. Evaluation of techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative individuals in the city of Itajaí, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2003;7:402–8.

Bollag DM, Rozycki MD, Edeinstein SJ. Protein Methods. 2^a ed. New York. Wiley-Liss, 1996.

Bon B, Houze S, Talabani H, Magne D, Belkadi G, Develoux M, Senghor Y, Chandenier J, Ancelle T, Hennequin C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(5):1716-9.

Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, Degani M, Anselmi M, Monteiro GB, 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 Vaccine Immunology*. 2007;14:129-33.

Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*. 2006;6(5):1471-82.

Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, Van Den Ende J, Bisoffi Z. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infectious Disease*. 2013; 8;13:78.

Castro-Borges W, Cartwright J, Ashton PD, Braschi S, Guerra Sa R, Rodrigues V, Wilson RA, Curwen RS. The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis. *Proteomics*. 2007;7:1065–75.

Center of Disease Control – CDC Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/strongyloidiasis.htm>> Acesso em 6 de fevereiro de 2013..

Concha R, Harrington JR W, Rogers AI. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. *Journal Clinical Gastroenterology*. 2005;39:203-11.

Conway DJ, Bailey JW, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28 kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;168:784-7.

Conway DJ, Lindo JF, Robinson RD, Bundy, Bianco AE. *Strongyloides stercoralis*: Characterization of immunodiagnostic larval antigens. *Experimental Parasitology*. 1994;79:99-105.

Costa-Cruz JM, Bullamah CB, Gonçalves-Pires Mdo R, Campos DM, Vieira MA. 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*. 1997;39:313-7.

Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DAO, Soplete MC, Campos DMB, Taketomi EA. Heterologous antigen extract in the ELISA for the detections of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2003;45(5):265-8.

Costa-Cruz, JM. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves DP et al. Parasitologia humana. 11ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

De Carli GA. Parasitologia Clínica – Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MRF, Gonçalves ALR, Rodrigues RM, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;67(2):153-61.

Fontes G, Oliveira KKL, Oliveira AKL, Rocha EMM. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36:625–8.

Genta RM, Lillibridge JP. Prominence of IgG4 antibodies in the human response to *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1989;160(4):692-8.

Gomes-Gallego S, Loukas A, Slade RW, Neva FA, Varatharajulu R, Nutman TB, Brindley PJ. Identification of an astacin-like metallo-proteinase transcript from the infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. *Parasitology International*. 2005;54(2):123-33.

Gonçalves AL, Nunes DS, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2012a;139(7):956-61.

Gonçalves AL, Rocha CA, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires Mdo R, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 2012b;72(1):79-84.

Gonzaga HT, Ribeiro Vda S, Cunha-Júnior JP, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011a;70(1):78-84.

Gonzaga HT, Ribeiro VS, Feliciano ND, Manhani MN, Silva DA, Ueta MT, Costa-Cruz JM. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunology Letters*. 2011b;139(1-2):87-92.

Gonzaga HT, Vila-Verde C, Nunes DS, Ribeiro VS, Cunha-Júnior JP, Costa-Cruz JM. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitology*. 2012;140(1):69-75.

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 Immunology Methods*. 1995;185(1):123-32.

Grove DI. Human strongyloidiasis. *Advances in Parasitology*. 1996; 38: 251-309.

Gryschek RCB, Siciliano RF. Estrongiloidíase. In: VERONESI. Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo. Atheneu, 2005.

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. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77(4):683-4.

Inês Ede J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, Silva MP, Teixeira MC, Soares NM. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Tropica*. 2011;120(3):206-10.

Inês Ede J, Silva MLS, Souza JN, Teixeira MCA, Soares NM. The role glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;76:31-5.

Irimenam N, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagnbenro-Beyioku. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitology International*. 2010;59:9-14.

Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The evidence-Based Medicine Working Group. *Journal of the American Medical Association*. 1994;271:703-7.

King SE, Mascie-Taylor CG. *Strongyloides fuelleborni kellyi* and other intestinal helminths in children from Papua New Guinea: associations with nutritional status and socioeconomic factors. *Papua New Guinea Medical Journal*. 2004;47(3-4):181-91.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2^a ed. Massachusetts: Blackwell Science, 2006.

Kobayashi J, Hasegawa H, Soares EC, Forli AA, Toma H, Correia- Dacal AR, Brito MC, Yamanaka A, Sato Y. Studies on prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the agar plate faecal culture method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1996;38:4,279-84.

Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N, Kita K, Ohtomo H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;45(4):518-21.

Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. *Indian Journal Gastroenterology*. 2004;23(6):214-16.

Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, McAuliffe I, Cajal SP, Won K, Juarez M, Di Paolo A, Tapia L, Acosta N, Lee R, Lammie P, Abraham D, Nutman TB. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17(10):1624-30.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-85.

Linke D. Detergents: an overview. *Methods Enzymology*. 2009;463:603-17.

Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1993;37(3):655-82.

Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;93:265-75.

Lutz A. O *Schistosoma mansoni* e a schistosomatose Segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1919,11:121-55.

Machado ER, Costa-Cruz JM. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998;93(2):161-64.

Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires Mdo R, de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. *Experimental Parasitology*. 2001;99(1):52-5.

Machado ER, Ueta MT, Pires MRFG, De Oliveira JBA, Faccioli LH, Costa-Cruz, JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human Strongyloidiasis by enzyme linked immunosorbent assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(6):849-51.

Machado ER, Teixeira EM, Paula FM, Gonçalves- Pires MRF, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Immunoparasitological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in garbage collectors in Uberlândia, MG, Brazil. *Parasitología Latinoamericana*. 2007;62:180-82.

Machado ER, Faccioli LH, Costa-Cruz JM, Lourenço EV, Roque-Barreira MC, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT. *Strongyloides venezuelensis*: The antigenic identity of eight strains for immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Experimental Parasitology*. 2008;119:7-14.

Machado ER, Carlos D, Sorgi CA, Ramos SG, Souza DI, Soares EG, Costa-Cruz JM, Ueta MT, Aronoff DM, Faccioli LH. Dexamethasone effects in the *Strongyloides venezuelensis* infection in a murine model. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;84(6):957-66.

Maia TMC, Vasconcelos PRL, Fauth S, Motta Neto R. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*. 2006;19(2):118-21.

Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. *Current Infectious Disease Reports*. 2011;13(1):35-46.

Mesquita Jr D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. Sistema Imunitário – Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira Reumatologia*. 2010;50(5):552-80.

Miné JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(6):565–9.

Mineo JR, Silva DAO, Sopolete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia LER, Bacchin MI. Medidas de Biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. 1 ed. Uberlândia. EDUFU, 2005.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. *Revista de Serviços em Saúde Pública*. 1948;1:507-624.

Mota-Ferreira DM, Gonçalves-Pires Mdo R, Júnior AF, Sopolete MC, Abdallah VO, Costa-Cruz JM. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. *Acta Tropica*. 2009;109(2):103-7.

Muniz-Junqueira MI, Queiroz FO. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35:133–41.

National Center for Biotechnology Information – NCBI. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2014.

Negrão-Corrêa DA, Pinho V, Souza D, Pereira ATM, Fernandes A, Scheurmann K, Hamer F, Souza AL, Maritns MM. Expression of IL-4 receptor on bone marrow derived cell is essential for the elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Journal of Parasitology*. 2006;36:1185-95.

Nemetschke L, Eberhardt AG, Hertzberg H, Streit A. Genetics, chromatin diminution and sex chromosome evolution in the parasitic nematode genus *Strongyloides*. *Current Biology*. 2010;20(19):1687-96.

Neter J, Kurtner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. 4^a ed. Illinois: Richard D. Irwing, 1996.

Northern C, Grove DI. *Strongyloides stercoralis*: antigenic analysis of infective larvae and adult worms. *International Journal for Parasitology*. 1990;30(3):381-7.

Northern C, Grove DI, Warton A, Lovegrove FT. Surface labelling of *Strongyloides ratti*: stage-specificity and cross-reactivity with *S. stercoralis*. *Clinical and experimental immunology*. 1989;75:487-92.

Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103:967-72.

Park JO, Pan J, Möhrle F, Schupp MO, Johnsen R, Baillie DL, Zapf R, Moerman DG, Hutte r H. Characterization of the astacin family of metalloproteases in *C. elegans*. *BMC Developmental Biology*. 2010;28;10:14.

Paula FM, De Castro E, Gonçalves-Pires M, Marçal M, Campos DM, Costa-Cruz JM. 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*. 2000;42(1):51-5.

Paula FM, Castro-Borges W, Júnior OS, de Souza Gomes M, Ueta MT, Rodrigues V. The ubiquitin-proteasome system in Strongyloidea. Biochemical evidence for developmentally regulated proteolysis in *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology Research*. 2009;105(2):567-76.

Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*. 2011;138(11):1331-40.

Paula FM, Gottardi M, Corral MA, Chieffi PP, Gryscek RCB. Is the agar plate culture a good tool for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in candidates for transplantation? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55(4).

Pires ML, Dreyer G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1993;48:175-82.

Pirisi M, Salvador E, Bisoffi Z, Gobbo M, Smirne C, Gigli C, Minisini R, Fortina G, Bellomo G, Bartoli E. Unsuspected strongyloidiasis in hospitalised elderly patients with and without eosinophilia. *Clinical Microbiology Infectious*. 2006;12(8):787-92.

Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002;125(1-2):73-81.

Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(e-2002):1-10.

Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonzaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. *Immunology Letters*. 2010;134(1):69-74.

Rigo CR, Lescano SAZ, de Marqui CR, Amato Neto V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41:648–53.

Rodrigues RM, Sopelete MC, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. *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*. 2004;99(1):89-93.

Rodrigues RM, Oliveira MC, Sopelete MC, Silva DAO, Campos DMB, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. IgG1, IgG4 and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitology Research*. 2007;101:1209-14

Rossi CL, Takahashi EEH, Teixeira ALS, Barros-Mazon S, Trevisan RCG. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1993a;26(2);83-7.

Rossi CL, Partel CD, Teixeira AL, Takahashi EE, De Barros-Mazon S, Da Silva LJ. Strongyloidiasis in Campinas city region (Brazil). *Tropical and Geographical Medicine*. 1993b;45(4):189-90.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes: modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 1954;53:248-50.

Santos LP, Santos FLN, Soares NM. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Salvador, Bahia. *Revista de Patologia Tropical*. 2007;36:237–46.

Sato H, Suzuki K, Osanai A, Kamiya H, Furuoka H. Identification and characterization of the threadworm, *Strongyloides procyonis*, from feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *Parasitology*. 2006;92(1):63-8.

Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R, Pulcheri W. The value of an immunoenzymatic teste (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65(4):346-50.

Segarra-Newnham M. Manifestations, diagnosis, and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2007;41:1992-2001.

Siddiqui AA, Koenig NM, Sinensky M, Berk SL. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. *Parasitology Research*. 1997;83:655-58.

Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious diseases*. 2001;33:1040-47.

Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(5):687-91.

Silva EF, Silva EB, Almeida KS, Sousa JJN, Freitas FLC. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 2009;38:35–43.

Souza EA, Silva-Nunes M, Malafronte RS, Muniz PT, Cardoso MA, Ferreira UM. Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007;23:427–34.

Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: importância e técnicas. *Revista de Patologia Tropical*. 2006;35:173–84.

Sudré AP, Siqueira RC, Barreto MG, Peralta RH, Macedo HW, Peralta JM. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitology Research*. 2007;101(4):1117-23.

Sultana Y, Gilbert GL, Ahmed BN, Lee R. Strongyloidiasis in a high risk community of Dhaka, Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(12):756-62.

Tefé-Silva C, Beneli CT, Celes MR, Machado ER, Ueta MT, Sorgi CA, Floriano EM, Faccioli LH, Ramos SG. Dexamethasone reduces bronchial wall remodeling during pulmonary migration of *Strongyloides venezuelensis* larvae in rats. *Parasitology International*. 2012;61(3):425-30.

Toledo MJO, Paludetto AW, Moura FT, Nascimento ES, Chaves M, Araújo SM, Mota LT. Avaliação de atividades de controle para enteroparasitoses em aldeia Kaingáng do Paraná. *Revista de Saúde Pública*. 2009;43: 981–90.

Triantaphyllou AC, Moncol DJ. Cytology, reproduction and sex determination of *Strongyloides ransomi* and *S. papillosus*. *Journal of Parasitology*. 1977;63:961-73.

Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;60:967–73.

Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JCFM, Wismans PJ, 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*. 2007;45(2):438-42.

Viney ME, Lok JB. *Strongyloides* spp. WormBook. 2007;23:1-15.

World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. Strongyloidiasis. Geneva: WHO; 2014. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/strongyloidiasis/en/> acesso em 18 de fevereiro de 2014.

Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A. Strongyloidiasis-progress in diagnosis and treatment. *Intern Medicine*. 2000; 39:695-700.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ___ F ___
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ___ F ___
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "IMUNODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA FRENTE A DIFERENTES EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE *Strongyloides venezuelensis*.
 PESQUISADOR: Dr. Ronaldo César Borges Gryscek
 CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL nº: 39.680 (CREMESP)
 UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 (três) anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. As informações seguintes estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que tem por objetivo inicial conhecer qual ou quais são os melhores métodos de diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*, sobretudo frente à imunodepressão. O conhecimento das melhores técnicas de diagnóstico da parasitose tem por objetivo reconhecer as pessoas infectadas, sobretudo os indivíduos imunodeprimidos em determinada área e tratá-las, antes do evento doença se agravar, com o objetivo final de eliminar essa doença desse local.
2. Os trabalhos executados pretendem avaliar os indivíduos com relação à infecção por *Strongyloides stercoralis*, através do exame parasitológico, isto é, da busca de larvas do parasito em amostras de fezes; de métodos de imunodiagnóstico, isto é, a detecção de anticorpos presentes no sangue, que são formados contra o parasito e da detecção do DNA, ou seja, material genético do parasito nas fezes (por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR)). Desses procedimentos, as técnicas da observação das larvas do parasito nas fezes são bem conhecidas, mas não são usadas de forma rotineira nos laboratórios de análises clínicas. Da mesma forma, a pesquisa de anticorpos contra o parasito, também são bem conhecidas, porém não são utilizadas em rotina diagnóstica. Já o processo de identificação do DNA do parasito nas fezes, ainda não é considerado para uso rotineiro, mas já existem estudos conhecidos que utilizaram esses métodos com sucesso. Os casos onde os exames comprovarem uma positividade para *S. stercoralis* serão avaliados e encaminhados para o tratamento que for mais apropriado ao estado clínico do paciente. Esse projeto constitui um avanço na aplicação de técnicas de diagnóstico da estrogiloidíase, uma vez que o diagnóstico através de métodos parasitológico de fezes, não é utilizado na rotina laboratorial, e isso diminui a possibilidade de diagnóstico e conseqüente tratamento precoce da doença, principalmente em condições de imunodepressão, além de permitir a adoção de medidas que possam eliminar a transmissão da parasitose. Deve ficar claro que sua participação é totalmente livre e voluntária e que sua eventual recusa em participar do estudo não ocasionará nenhum tipo de prejuízo pessoal ao (à) Sr(a) e sua família.
3. Sua participação no estudo consiste em:
 - A. Fornecer uma amostra de fezes
 - B. Fornecer uma amostra de sangue (7 mL), através da punção de uma veia periférica no antebraço.
4. Tais procedimentos não envolvem risco importante à sua saúde. No entanto, a obtenção da amostra de sangue pode ocasionar desconforto em função da picada para a coleta. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.
5. O benefício direto para cada participante individualmente ocorrerá no caso de ser detectada a presença de larvas de *S. stercoralis* nas fezes ou anticorpos contra o mesmo no sangue. Nesse caso o participante será tratado com o remédio adequado. Além disso, poderão ser detectadas outras parasitoses intestinais que também serão tratadas de forma adequada. O maior benefício será, no entanto, para todos os imunodeprimidos, pois a verificação da melhor forma de diagnosticar os doentes permitirá o seu tratamento precoce e evitará a possibilidade de agravamento da parasitose.
6. Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.
7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek que poderá ser encontrado no Laboratório de Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, na A. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 500, prédio II, 2º andar, telefone 11- 3061-8220. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º andar – telefone 11 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20; FAX 11 3069-6442 ramal 26 – email: hcapesq@hcnet.usp.br

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento, se for o caso.
9. Direito de confidencialidade – as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
10. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados. Os resultados dos exames serão fornecidos individualmente aos pacientes durante seu acompanhamento ambulatorial. Se consentido, os dados dos exames constarão nos prontuários dos pacientes para o acompanhamento da rotina ambulatorial.
11. Despesas e compensações: não há nenhuma espécie de despesa pessoal para o participante em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e remédios que venham a ser indicados no tratamento de alguma parasitose identificada. Da mesma forma não há compensação financeira relacionada à sua participação. Caso surja alguma despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12. Solicitamos também sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR *S. stercoralis* EM PACIENTES COM IMUNODEPRESSÃO"

Eu discuti com o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou também claro que a minha participação é isenta de despesas.. Concordo voluntariamente a participar desse estudo e estou ciente que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente / representante legal

São Paulo, _____ de 2012.

Assinatura de testemunha, para casos de participantes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

São Paulo, _____ de 2012.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo

Dr. Ronaldo César Borges Gryscek

Apêndice B- Aprovação projeto pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: IMUNODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA FRENTE A DIFERENTES EXTRATOS ANTIGÊNICOS DE STRONGYLOIDES VENEZUELENSIS.

Pesquisador Responsável: Ronaldo Cesar Broges Gryschek **Versão:** 1

Pesquisador Executante: Marcelo Andreetta Corral

CAAE: 03203513.8.0000.0068

Co-autores: Fabiana Martins de Paula, Maiara Gottardi, Pedro Paulo Chieffi

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9569

Número do Parecer: 266.046

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto: Os autores visam aperfeiçoar técnicas para o diagnóstico definitivo da Estrongiloidíase e para isto propõem-se a preparar antígenos extraídos das membranas de larvas do parasito e utilizá-los em testes sorológicos. Irão preparar e estudar frações antigênicas nos laboratórios do Instituto de Medicina Tropical: IMT-USP. Nesse contexto o trabalho busca resposta a seguinte indagação: Quais frações do extrato bruto dos

estágios evolutivos, larva filarióide e fêmea partenogenética de Strongyloides venezuelensis podem ser aplicadas no diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana? As técnicas a serem realizadas serão as de ELISA e de western-blot. Testes serão realizados em 90 amostras de sangue de 90 pacientes ambulatoriais com idades de 10 a 60 anos, de ambos os sexos, atendidos no Hospital das Clínicas da FMUSP, divididos em três Grupos i-)Positivo: 30 pacientes com diagnóstico parasitológico (exame de fezes) positivo para S. stercoralis; ii-) Negativo: 30

pacientes com diagnóstico parasitológico negativo;iii-)Outras parasitoses: 30 pacientes com diagnóstico parasitológico para outras parasitoses intestinais. Não haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc). Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco para utilização em estudos futuros

Objetivo da Pesquisa: Objetivo primário: implementar técnicas sorológicas (ELISA e Western-Blot) para o diagnóstico da estrongiloidíase humana,utilizando antígenos brutos de larvas filarióides e fêmeas partenogenéticas de S. venezuelensis. Objetivo secundário: comparar extratos dos estágios evolutivos, larvas filarióides e fêmeas partenogenéticas de S. venezuelensis, através da eletroforese em gel de poliacrilamida uni e bidimensional; Aplicação e avaliação das frações do extrato bruto dos estágios evolutivos, larva filarióide e fêmea partenogenética de S. venezuelensis no diagnóstico da estrongiloidíase humana, utilizando as técnicas de ELISA e WB.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos: Riscos mínimos, decorrentes de uma punção venosa. Benefícios: Obtenção de técnicas diagnósticas eficazes para a estrongiloidíase humana.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O diagnóstico parasitológico pelas técnicas tradicionais tem baixa sensibilidade. Dessa forma, a disponibilização de técnicas diagnósticas

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br