



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Parasitologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

João Gustavo Mendes Rodrigues

**APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS E SOROLÓGICAS  
PARA O DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE: ESTUDO EXPERIMENTAL E  
EM AMOSTRAS HUMANAS DE ÁREA ENDÊMICA**

Belo Horizonte  
2024

João Gustavo Mendes Rodrigues

**APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS E SOROLÓGICAS  
PARA O DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE: ESTUDO EXPERIMENTAL E  
EM AMOSTRAS HUMANAS DE ÁREA ENDÊMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

Área de concentração: Helminologia.

Belo Horizonte  
2024

043

Rodrigues, João Gustavo Mendes.

Aprimoramento de técnicas parasitológicas e sorológicas para o diagnóstico da estrogiloidíase: estudo experimental e em amostras humanas de área endêmica [manuscrito] / João Gustavo Mendes Rodrigues. – 2024.  
200 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Strongyloides. 3. Diagnóstico. 4. Imunoglobulinas. 5. Carga Parasitária. I. Negrão-Corrêa, Deborah Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TESE 354/2024/03**

**TÍTULO DA TESE: "APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS E SOROLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE: ESTUDO EXPERIMENTAL E EM AMOSTRAS HUMANAS DE ÁREA ENDÊMICA"**

**ALUNO: JOÃO GUSTAVO MENDES RODRIGUES**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e nove de fevereiro de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

**Paulo Marcos Zech Coelho**

Membro externo - CPqRR

**Silvio Santana Dolabella**

Membro externo - UFS

**Vitor Luis Tenório Mati**

Membro externo - UFLA

**Ricardo Toshio Fujiwara**

Membro interno - UFMG

**Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Silvio Santana Dolabella, Usuário Externo**, em 01/03/2024, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Deborah Aparecida Negrão Correa, Professora do Magistério Superior**, em 01/03/2024, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vitor Luís Tenório Mati, Usuário Externo**, em 01/03/2024, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2024, às 10:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Marcos Zech Coelho, Usuário Externo**, em 05/03/2024, às 09:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3026551 e o código CRC 24D60F6A.

## **LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS:**

**ESQUISTOSSOMOSE E IMUNOHELMINTOLOGIA - ICB/UFMG**  
Profa. Dra. Deborah Ap. Negrão-Corrêa

**HELMINTOSES INTESTINAIS - ICB/UFMG**  
Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

**LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA – ICBS/UFAL**  
Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto

**LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECTO-PARASITARIAS - UNCISAL**  
Profa. Dra. Flaviana Santos Wanderley

## **APOIO FINANCEIRO:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Saúde através do edital Pesquisas Sobre Doenças Transmissíveis e Negligenciadas DECIT/CNPq/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SCTIE, Nº 22/2019 – processo Nº 442994/2019-2

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – através do edital FAPEAL/PPSUS/ DecitSCTIE-MS/CNPq/SESAU-AL, Nº 06/2020 – processo Nº EFP-00023144

Projeto de Extensão e Prestação de Serviço do Departamento de Parasitologia - Instituto de Ciências Biológicas (CENEX-ICB)

*Aos meus pais, Kátia e Plácido, pelo amor, carinho e apoio incondicional.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e oportunidade de viver imensamente na busca dos meus sonhos com coragem e atitude, com tropeços e vitórias, permitindo-me caminhar até esse exato momento.

Aos meus pais, Kátia Mendes e Plácido Rodrigues, pela excelente educação e incentivo desde pequeno, me priorizando e oferecendo sempre o melhor caminho a ser seguido, com apoio incondicional para superar os obstáculos, e por sempre sonharem os meus sonhos.

Às minhas irmãs, Ana Flávia e Mônica Mariana, que estiveram torcendo por mim nessa caminhada, proferindo sempre palavras de apoio. E a todos meus familiares que, de alguma forma, ajudaram na construção desse sonho; em especial, à minha avó Eladir Lourdes e minha madrinha Concita Mendes.

À minha orientadora, Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, por sua paciência, motivação e imenso conhecimento, me recebendo de abraços abertos sem nenhum obstáculo desde os experimentos que realizamos em parceria na época do mestrado, me deixando livre e confortável para trabalhar. Meu sentimento de gratidão é imensurável por toda sua assistência e envolvimento durante esses anos de doutorado. Sigo em frente com a certeza de não ter conseguido apenas uma excelente orientadora, mas também uma grande parceria e amizade que levarei comigo por toda a vida! Obrigado <3

Aos profs. Dr. Wagner José Nascimento Porto (UFAL) e Dra. Flaviana Wanderley (UNCISAL) por todo apoio e parceria de milhões! Sou muitíssimo grato pela recepção e hospedagem de mil estrelas assim que cheguei em Maceió e por toda ajuda e dedicação nas coletas de campo e obtenção das amostras. Agradeço também ao seus orientados pelas trocas de conhecimento, colaboração e pela amizade.

Ao prof. Dr. Stefan Geiger (UFMG) por toda contribuição, parceria e críticas construtivas que fizeram meu trabalho ficar melhor; pelas ótimas idas ao campo e disponibilização de toda infraestrutura de seu laboratório.



Ao Laboratório de Imunohelmintologia (e agregados), do qual fiz parte nesses anos de doutorado e onde passei grande parte do meu tempo ao lado pessoas incríveis que tive o prazer de fazer laços de amizade: Ana Melgaço, Jeferson Oliveira, Genil Camelo, Guilherme Miranda, Laura Maggi, Michelle Rezende, Vinicius Oliveira, Vanessa Rodrigues, João Marcelo, Elis Paula, Fernanda Magalhães, Caio Gouveia, Samira Resende, Jamilly Victoria. E agradeço também aos funcionários Elizabeth Lacorte (Beth) e José Carlos dos Reis (Zé) pelo maravilhoso e essencial serviço prestado ao nosso laboratório e às nossas pesquisas.

Aos meus inseparáveis amigos da “rua da casa” (Crazy Kids <3) Carlos Neves, Luana Araújo, Juliana Neres, Anderson Araújo, Anderson Brito, Jeane Ribeiro, Manoel Fontenele, Diego Araújo, Paulo James, Euzébio Rodrigues, Jonh Loren, Wesley Benjamin, Gabriel Natan e Eudâmidas Junior por todo amor, carinho e fidelidade, SEMPRE!!! O apoio de vocês foi essencial para eu continuar essa jornada!

Aos meus escudeiros fiéis e grandes amigos da UEMA, Dra. Maria Gabriela, Dra. Ranielly Nogueira, Dra. Gleycka Cristine, Dra. Lorrane Cantanhede, Dra. Fernanda Carvalho, Dra. Roberta Sabine, Thiago Vinicius e Dra. Irla Lica pelo grande apoio e parceria nas pesquisas, artigos publicados, editais aceitos, premiações e, sem dúvida, pela grande amizade!

Ao meu companheiro e parceiro da vida, Dr. Guilherme Miranda, a quem compartilho de inúmeros momentos maravilhosos. Muito obrigado por sempre me apoiar, me abrilhantar com belíssimas e geniais ideias, pelos ensinamentos sobre a vida, pelo enorme e gratificante prazer de compartilhar cada momento da sua vida comigo nesses 11 anos! Amo você <3

Aos meus amigos de Belo Horizonte, Dra. Williane Siqueira, Dra. Danimar Lopez, Arthur Teixeira, Igor Penaforte, Carol Marinho, Daniela Gomes, Isabelle Siqueira e Izinha Magalhães por todos os momentos juntos, as festas, os choros, as viagens, as trilhas, os drinks, o vôlei aos sábados... Obrigado por fazerem BH ser um lar para mim nesses anos, levarei vocês comigo pra sempre!

Aos amigos que o PPGPAR me deu, Jordânia Costa, Ana Cristina, Tatyane Cirilo, Chiara Amorim, Dharliton Gomes, Paulo Ricardo, Allan Severino, Beatriz Peçanha, Talita Rodrigues, Jorge Lucas, João Alexander, Aline Marzano, Carol Antunes, Marcela Mattos e Luiz Gustavo, pela grande amizade, pelas viagens, pelos dias e noites em que me fizeram companhia nos estudos, trabalhos, seminários das disciplinas, coletas de campo e por toda dedicação me ajudando no que fosse preciso.

Aos meus amigos e irmãos de coração Carlos Martins, Remy Cutrim, Jó Silva e Davi Viegas pelos melhores conselhos, melhores ouvidos, melhores brigas, melhores abraços e melhores momentos!

Às maravilhosas secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia/ICB/UFMG, Sibebe Abreu e Sumara Guilherme, por toda paciência e auxílio em esclarecer todas as dúvidas e resolver questões burocráticas relacionadas à pós-graduação.

Ao CNPq, FAPEAL, DECIT e CENEX pela bolsa recebida e financiamento.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a construção deste trabalho.  
Muito obrigado!

*“Pode se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a  
pessoa se lembrar de acender a luz.”*



**Alvo Dumbledore.**

## Resumo

A estrogiloidíase é uma doença negligenciada causada principalmente por *Strongyloides stercoralis*, um nematóide que pode persistir por décadas no hospedeiro humano com carga parasitária baixa e sem sintomas específicos. O principal obstáculo para controle dessa infecção reside na baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos utilizados no diagnóstico e na falta de padronização e validação das alternativas de diagnóstico imunológico. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver, padronizar e avaliar testes parasitológicos e sorológicos para melhorar a sensibilidade do diagnóstico da estrogiloidíase, utilizando infecção experimental de ratos e amostras humanas coletadas em área endêmica. A primeira parte do estudo foi realizada em ratos Wistar infectados com diferentes cargas (10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub>) de *S. venezuelensis* (Sv), tratados ou não com dexametasona ou ivermectina, e acompanhados por um período de 60 dias. Amostras de fezes e sangue foram coletadas e utilizadas para avaliar a eficácia de diferentes métodos parasitológicos, o perfil de leucócitos circulantes e reatividade de diferentes imunoglobulinas. A técnica de Rugai modificada (RMOD), apresentou maior sensibilidade na detecção de larvas em todos os grupos experimentais avaliados, principalmente nos grupos infectados com baixa carga, em comparação às demais técnicas parasitológicas avaliadas. A infecção experimental em ratos induziu aumento significativo de leucócitos circulantes especialmente na fase aguda, enquanto o aumento de eosinófilos circulantes foi associado a presença do parasito, sendo demonstrado uma redução precoce destas células no grupo de ratos infectados e tratados com ivermectina, confirmando sua relação com a infecção ativa por *S. venezuelensis*. A produção de IgM, IgG e IgG1 anti-L<sub>3</sub> e anti-Sv foram elevados em todos grupos experimentais infectados independente da carga parasitária, mas a reatividade se manteve elevada mesmo após a cura parasitológica. Em contraste, a reatividade plasmática de IgG2a anti-L<sub>3</sub> e anti-Sv e de IgA anti-ES/L3 no lavado intestinal foi melhor associada a infecção ativa, retornando aos níveis basais nos animais curados ou tratados. A segunda parte do estudo foi realizada com 68 indivíduos residentes de Vergel do Lago, Maceió, AL, que concordaram em participar da pesquisa e forneceram amostras de fezes para testes parasitológicos e de sangue para análises sorológicas. A acurácia diagnóstica de cada teste foi avaliada em relação ao Padrão de Referência Consolidado (CRS) estabelecido utilizando múltiplos testes parasitológicos, indicando uma prevalência estimada de 8,82% (6/68) de estrogiloidíase na população estudada. As técnicas parasitológicas de cultura em placa de ágar (CPA) e sedimentação espontânea (SS) apresentaram sensibilidade de 50% e 33,3%, respectivamente; enquanto, a técnica RMOD detectou todos os indivíduos infectados, demonstrando 100% de sensibilidade. A reatividade sérica de IgG4 anti-L<sub>3</sub> apresentou o melhor desempenho diagnóstico, com sensibilidade e especificidade de 80% e 98,3%, respectivamente; e com melhor concordância ao CRS (kappa= 0.783). Esses dados demonstram que a técnica RMOD e o ensaio baseado na reatividade de IgG4 anti-L<sub>3</sub> apresentaram melhor desempenho para detecção da infecção por *Strongyloides* spp. em indivíduos com baixa carga parasitária, permitindo um diagnóstico mais sensível para estrogiloidíase.

**Palavras-chave:** *Strongyloides*; diagnóstico; Rugai-modificado; imunoglobulinas; baixa carga parasitária.

## Abstract

Strongyloidiasis is a neglected disease caused mainly by *Strongyloides stercoralis*, a nematode that can persist for decades in the human host with a low parasite burden and without specific symptoms. The main obstacle to control this parasitic infection is the low sensitivity of the parasitological methods used in diagnosis and the lack of standardization and validation of immunological diagnostic alternatives. Therefore, this study aims to develop, standardize, and evaluate parasitological and serological tests to improve the sensitivity of the diagnosis of strongyloidiasis, using experimental infection of rats and human samples collected in an endemic area. The first part of the study was performed in Wistar rats infected with different burdens (10L3 or 500L3) of *S. venezuelensis* (Sv), treated or not with dexamethasone or ivermectin, and followed for 60 days. Fecal and blood samples were collected to evaluate the effectiveness of different parasitological methods, circulating leukocyte profiles, and the reactivity of diverse immunoglobulin isotypes. The modified Rugai technique (RMOD) showed greater sensitivity in detecting larvae in all experimental groups evaluated, especially in groups infected with low parasite burden, compared to the other parasitological techniques evaluated. The experimental infection induced a significant increase in circulating leukocytes, especially in the acute phase. The increase in circulating eosinophils was associated with the presence of the parasite, and an early reduction in these cells was demonstrated in rats infected and treated with ivermectin, confirming its relationship with active infection by *S. venezuelensis*. The production of IgM, IgG, and IgG1 anti-L3 and anti-Sv was elevated in all infected experimental groups regardless of the parasite burden, however, the reactivity remained elevated even after the parasitological cure. In contrast, the reactivity of IgG2a to L3 and adult worm antigens in plasma, and anti-ES/L3 IgA in the intestinal lavage was better associated with active infection, returning to the baseline levels in cured or treated animals. The second part of the study was performed with 68 individuals living in Vergel do Lago, Maceió, AL, who agreed to participate in the research and provided fecal samples for parasitological tests and blood samples for serological analysis. The diagnostic accuracy of each test was evaluated in comparison to the Consolidated Reference Standard (CRS) established using multiple parasitological tests that estimated a prevalence of 8.82% (6/68) for strongyloidiasis in the studied population. The parasitological techniques of agar plate culture (AP-C) and spontaneous sedimentation (SS) showed a sensitivity of 50% and 33.3%, respectively; while, the RMOD technique detected all infected individuals, demonstrating 100% sensitivity. The serum IgG4 anti-L3 reactivity showed the best diagnostic performance, with sensitivity and specificity of 80% and 98.3%, respectively; and also, better agreement with the CRS ( $\kappa=0.783$ ). These data demonstrate that the RMOD technique and the assay based on IgG4 anti-L3 reactivity presented a better performance for detecting infection by *Strongyloides* spp. in individuals with low parasite burden, allowing a more sensitive diagnosis for strongyloidiasis.

**Keywords:** *Strongyloides*; diagnosis; Rugai-modified; immunoglobulins; low parasite burden.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência global da estrogiloidíase estimada para 2017 .....	26
Figura 2. Fotomicrografia da fêmea parasita partenogenética de <i>Strongyloides</i> .....	31
Figura 3. Fotomicrografia do ovo embrionado (A) e larvado (B) de <i>Strongyloides</i> .....	32
Figura 4. Fotomicrografia dos estágios larvais de <i>Strongyloides</i> .....	33
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	35
Figura 6. Ilustração hipotética dos títulos de diferentes isotipos de imunoglobulinas durante o curso da infecção por estrogiloidíase em indivíduos imunocompetentes .....	52
Figura 7. Delineamento experimental I .....	65
Figura 8. Delineamento experimental II.....	68
Figura 9. Procedimento de coleta e preparação da amostra de fezes.....	69
Figura 10. Técnicas parasitológicas utilizadas na quantificação de ovos e/ou larvas de <i>S. venezuelensis</i> nas fezes dos ratos experimentais .....	72
Figura 11. Técnica parasitológica de Rugai-modificado .....	73
Figura 12. Localização da área de estudo .....	80
Figura 13. Delineamento do estudo em residentes de Vergel do Lago, Maceió, AL.....	83
Figura 14. Número médio de vermes recuperados do intestino delgado de ratos da linhagem <i>Wistar</i> após 15, 30 e 45 dias de infecção com diferentes cargas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico .....	89
Figura 15. Avaliação da eficácia das técnicas de Baermann-Moraes, Rugai e Harada-Mori na recuperação de larvas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em fezes de ratos experimentalmente infectados .....	91
Figura 16. Condição representativa do sedimento final obtido a partir das técnicas Rugai original (RO) e modificado (RMOD) .....	93
Figura 17. Avaliação da eficácia das técnicas de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) na recuperação de larvas e/ou ovos em fezes de ratos da linhagem <i>Wistar</i> infectados com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico .....	95
Figura 18. Avaliação da eficácia entre as técnicas de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) na recuperação de larvas e/ou ovos em fezes de ratos da linhagem <i>Wistar</i> infectados com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico .....	98
Figura 19. Contagem de leucócitos totais e diferenciais presente na corrente sanguínea de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina.....	101

Figura 20. Contagem de leucócitos total e diferencial presente na corrente sanguínea de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	103
Figura 21. Níveis de IgM parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	106
Figura 22. Níveis de IgM parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	108
Figura 23. Níveis de IgG parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	110
Figura 24. Níveis de IgG parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	112
Figura 25. Níveis de IgG1 parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	114
Figura 26. Níveis de IgG1 parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	116
Figura 27. Níveis de IgG2a parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	118
Figura 28. Níveis de IgG2a parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	120
Figura 29. Níveis de IgA parasito-específica no plasma de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> ou 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	121
Figura 30. Níveis de IgA parasito-específica no lavado intestinal de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	123
Figura 31. Níveis de IgA parasito-específica no lavado intestinal de ratos <i>Wistar</i> durante a infecção com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e após tratamento com dexametasona ou ivermectina .....	125
Figura 32. Contagem de larvas detectadas pelas técnicas de Rugai-modificado (RMOD) e Cultura em placa de ágar (CPA) em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil, infectados por <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	129

Figura 33. Níveis de reatividade dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG4 contra antígenos solúveis de L <sub>3</sub> ou verme adulto de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em soros de moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil .....	130
Figura 34. Curva ROC da reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 contra preparações antigênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> (L <sub>3</sub> e Sv) em soros de moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil .....	132
Figura 35. Análise da curva TG-ROC da reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 contra preparações antigênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> (L <sub>3</sub> e Sv).....	133
Figura 36. Especificidade dos ensaios sorológicos baseados na reatividade de IgG e IgG4 contra os antígenos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> (L <sub>3</sub> ou Sv) para detectar indivíduos infectados por <i>S. stercoralis</i> em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil .....	137



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas no ensaio de ELISA .....	78
Tabela 2. Percentual de infecção e quantidade de vermes recuperados do intestino delgado de ratos da linhagem <i>Wistar</i> após 15, 30 e 45 dias de infecção com 10L <sub>3</sub> (baixa carga) ou 500L <sub>3</sub> (alta carga) de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados ou não com imunossupressor ou antiparasitário .....	90
Tabela 3. Avaliação da eficácia das técnicas Rugai original (RO) e Rugai modificada (RMOD) na recuperação de larvas do parasito em fezes de ratos em diferentes momentos após infecção com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	92
Tabela 4. Taxas de detecção de infecção obtidas pela técnica de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) em ratos <i>Wistar</i> infectados com 500L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico analisados em diferentes períodos .....	96
Tabela 5. Taxas de detecção de infecção obtidas pela técnica de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) em ratos <i>Wistar</i> infectados com 10L <sub>3</sub> de <i>Strongyloides venezuelensis</i> e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico analisados em diferentes períodos .....	99
Tabela 6. Caracterização demográfica e perfil parasitológico dos moradores da comunidade de Vergel do Lago, município de Maceió, Alagoas, Brasil .....	127
Tabela 7. Desempenho diagnóstico das técnicas parasitológicas de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) comparada ao Padrão de Referência Consolidado (CRS) para detecção da estrogiloidíase em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil .....	128
Tabela 8. Valores de corte para reatividade, sensibilidade, especificidade e área sob a curva (AUC) das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 para os diferentes extratos antigênicos .....	134
Tabela 9. Desempenho diagnóstico dos ensaios sorológicos IgG, IgG1 e IgG4 contra preparações antigênicas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> (L <sub>3</sub> e Sv) em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil .....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Abs</b>	Absorbância	<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>ADCC</b>	Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos	<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>Ag</b>	Antígeno	<b>KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de potássio
<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida	<b>L</b>	Litro
<b>ANOVA</b>	Análise de variância	<b>L1</b>	Larva de primeiro estágio
<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígeno	<b>L2</b>	Larva de segundo estágio
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin	<b>L3</b>	Larva de terceiro estágio
<b>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub></b>	Ácido cítrico	<b>MBP</b>	Proteína básica principal
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais	<b>mg</b>	Miligrama
<b>Cm</b>	Centímetros	<b>mL</b>	Mililitro
<b>COEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa	<b>mM</b>	Milimolar
<b>Cpa3Cre</b>	Camundongos deficientes em mastócitos de mucosa	<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetros cúbicos
<b>CPA</b>	Cultura em placa de ágar	<b>MPO</b>	Mieloperoxidase de neutrófilo
<b>CXCR2</b>	Quimicina de expressão do receptor CXC 2	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato dissódico
<b>DAF-12</b>	Receptor nuclear de Das	<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>DAs</b>	Ácido dafacrônico	<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>DPI</b>	Dias após infecção	<b>nM</b>	Nanometro
<b>ECP</b>	Proteína catiônica de eosinófilos	<b>OPD</b>	o-Phenylenediamine Dihydrochloride
<b>EDN</b>	Neurotoxina derivada de eosinófilos	<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>EDTA</b>	Ethylenediamine tetraacetic acid	<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	<b>pNPP</b>	p-Nitrofenil Fosfato
<b>EPO</b>	Peroxidase de Eosinófilo	<b>RMOD</b>	Rugai-modificado
<b>ES</b>	Antígeno excretado-secretado	<b>RO</b>	Rugai original
<b>FcR</b>	Receptor de Imunoglobulina	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>FSC</b>	Forward Scatter	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute (Meio de Cultura)
<b>g</b>	Gramas	<b>SEM</b>	Erro padrão
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	<b>SH</b>	Camundongos mutantes que não diferenciam mastócitos. Kit <sup>w-sh</sup> knockout mice
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água	<b>SS</b>	Sedimentação espontânea
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico	<b>Sv</b>	Verme adulto de <i>S. venezuelensis</i>
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana	<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase	<b>TGF-β</b>	Tumor Growth Factor Beta
<b>HTLV-1</b>	Vírus linfotrópico para células T Humanas do tipo 1	<b>Th-1</b>	Linfócitos T CD4+ auxiliares do tipo 1
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas	<b>Th-2</b>	Linfócitos T CD4+ auxiliares do tipo 2
<b>Ig</b>	Imunoglobulina	<b>TNF-α</b>	Tumor Necrosis Factor Alpha
<b>IL</b>	Interleucina	<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>IP</b>	Via intraperitoneal		

<b>W/W<sub>v</sub></b>	Camundongos que apresentam deficiência na diferenciação de mastócitos
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>WT</b>	Camundongos Selvagens
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Epidemiologia da estrogiloidíase .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Aspectos biológicos da infecção por <i>Strongyloides</i> .....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Ciclo de desenvolvimento de <i>S. stercoralis</i> .....	33
<b>2.3 Aspectos patológicos e imunológicos da infecção por <i>Strongyloides</i>..</b>	<b>36</b>
<b>2.4 Diagnóstico da estrogiloidíase .....</b>	<b>45</b>
2.4.1 Métodos Parasitológicos .....	46
2.4.2 Métodos Moleculares .....	47
2.4.3 Métodos Imunológicos .....	48
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>55</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Geral .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Específicos .....</b>	<b>58</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Modelo Experimental .....</b>	<b>61</b>
5.1.1 Animais .....	61
5.1.2 Parasito.....	61
5.1.3 Obtenção de larvas filarioides e infecções experimentais .....	61
5.1.4 Obtenção dos antígenos.....	62
5.1.5 Delineamentos experimentais.....	63
5.1.5.1 Delineamento experimental I .....	64
5.1.5.2 Delineamento experimental II .....	66
5.1.6 Coleta e preparo do material fecal .....	69
5.1.7 Técnicas Parasitológicas .....	69
5.1.7.1 Método de Baermann-Moraes .....	69
5.1.7.2 Método de Harada-Mori.....	70
5.1.7.3 Cultura em placa de ágar .....	70
5.1.7.4 Sedimentação espontânea .....	71
5.1.7.5 Técnica de Rugai original .....	71
5.1.7.6 Técnica de Rugai-modificado .....	72
5.1.8 Recuperação de vermes de <i>S. venezuelensis</i> no intestino.....	74

5.1.9	Obtenção de sangue e plasma .....	74
5.1.10	Avaliação leucométrica .....	74
5.1.11	Detecção de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	75
5.1.12	Obtenção do lavado intestinal e dosagem de IgA.....	77
5.1.13	Análise estatística dos dados obtidos em modelo experimental .....	78
<b>5.2</b>	<b>População humana .....</b>	<b>79</b>
5.2.1	Caracterização da área de estudo .....	79
5.2.2	População de estudo e considerações éticas .....	80
5.2.3	Delineamento experimental da população em estudo .....	81
5.2.4	Avaliação parasitológica .....	83
5.2.5	Ensaio imunoenzimático padronizado .....	84
5.2.6	Análise estatística dos dados da população humana .....	86
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>6.1</b>	<b>Modelo experimental .....</b>	<b>88</b>
6.1.2	Recuperação de vermes adultos para determinação dos períodos de análise no modelo experimental .....	88
6.1.2	Avaliação e seleção do método parasitológico de concentração para uso ao longo do trabalho em modelo experimental .....	90
6.1.3	Avaliação da eficácia do diagnóstico entre as técnicas de Rugai-original e modificado .....	91
6.1.4	Avaliação comparativa da eficácia do diagnóstico pela técnica de Rugai-modificada em relação a diferentes técnicas parasitológicas .....	93
6.1.5	Avaliação da leucometria global e diferencial .....	99
6.1.6	Reatividade relativa de IgM a diferentes extratos antigênicos de <i>S. venezuelensis</i> .....	104
6.1.7	Reatividade relativa de IgG e dos isotipos IgG1 e IgG2a a diferentes extratos antigênicos de <i>S. venezuelensis</i> .....	109
6.1.8	Reatividade relativa de IgA a diferentes extratos antigênicos de <i>S. venezuelensis</i> .....	121
<b>6.2</b>	<b>População humana .....</b>	<b>126</b>
6.2.1	Caracterização e perfil parasitológico da população em estudo .....	126
6.2.2	Desempenho da técnica de Rugai-modificado (RMOD) no diagnóstico de <i>Strongyloides stercoralis</i> em indivíduos infectados na população em estudo .....	127

6.2.3	Reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 frente a diferentes extratos antigênicos de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	129
6.2.4	Determinação dos valores de corte para diferentes reatividades de imunoglobulinas e extratos antigênicos .....	130
6.2.5	Desempenho e sensibilidade dos testes sorológicos como ferramenta diagnóstica para infecção ativa por <i>Strongyloides stercoralis</i> na população em estudo .....	134
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>138</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>149</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>151</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>185</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>189</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

---

A estrogiloidíase humana é uma doença parasitária negligenciada causada principalmente por nematódeos da espécie *Strongyloides stercoralis*, sendo mais frequentemente encontrada em regiões tropicais e subtropicais que apresentam condições sanitárias precárias, fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento do parasito, e com populações socioeconomicamente desfavorecidas e sem conhecimento adequado sobre a parasitose (OLSEN *et al.*, 2009; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013; ANDERSON *et al.*, 2014; PAGE; SPEARE, 2016). Estimativas mais recentes têm indicado que cerca de 600 milhões de pessoas estão infectadas por esse nematódeo ao redor do mundo, principalmente em áreas localizadas no Sudeste Asiático, África, Pacífico Ocidental e América Latina (BUONFRATE *et al.*, 2020; WHO, 2023). O Brasil é considerado uma área endêmica para a estrogiloidíase, sendo estimado que entre os anos de 1990 e 2009 a prevalência média da infecção foi de 5,5% (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011); entretanto, estimativas recentes baseadas em modelagem estatística indicam que a prevalência da infecção no país possa atingir cerca de 11% (BUONFRATE *et al.*, 2020). A maioria dos estudos apontam uma grande dificuldade para obter estimativas precisas de prevalência da estrogiloidíase, e esta grande variação de dados tem sido associada especialmente à complexidade de desenvolvimento biológico desse parasito, ao difícil diagnóstico clínico, uma vez que a maioria dos infectados são assintomáticos, e à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos disponíveis (KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019).

O ciclo de vida de espécies do gênero *Strongyloides* é complexo quando comparado a outros nematódeos, alternando gerações de vida livre e vida parasitária, sendo que na infecção humana pela espécie *S. stercoralis* também ocorre o fenômeno de autoinfecção interna e externa (TOLEDO *et al.*, 2015). O homem se infecta com a penetração percutânea de larvas filarióides do parasito, que migram principalmente através da circulação sanguínea, passando pelos pulmões até alcançarem o intestino delgado, onde concluem seu desenvolvimento até a fase adulta. Vermes adultos presentes no intestino são exclusivamente fêmeas, que produzem seus ovos por partenogênese e os liberam no intestino delgado do hospedeiro, onde larvas rabditóides se desenvolvem e eclodem (PUTHIYAKUNNON *et al.*, 2014; VINEY; LOK, 2015; BRELOER; ABRAHAM, 2017). Grande parte das larvas rabditóides é eliminada junto às fezes do hospedeiro, porém uma pequena parte dessas larvas pode evoluir até a forma infectante e repenetrar na mucosa do intestino grosso e reto ou mesmo



na região perianal, induzindo o processo de autoinfecção, responsável pelas infecções crônicas de longa duração em humanos, mesmo sem reexposição a áreas contaminadas (GROVE; NORTHERN, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

A evolução clínica da estrogiloidíase humana é bastante variada, sendo que a carga parasitária e a resposta imunológica do hospedeiro são fatores essenciais nesse processo (CONCHA *et al.*, 2005; OLSEN *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que alguns indivíduos de áreas endêmicas podem ser reativos ao parasito, mesmo sem apresentarem infecção ativa, sugerindo que houve exposição e cura espontânea. Todavia, a grande maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos e apresentam baixa carga parasitária, ou quando apresentam sintomatologia, as alterações são inespecíficas (VADLAMUDI *et al.*, 2006; MARCOS *et al.*, 2008). Os casos com sintomas exacerbados e disseminação do parasito, ocorrem em 1,5 a 2,5% dos pacientes infectados (MILDER *et al.*, 1981), geralmente associados a um estado de imunossupressão do hospedeiro que, em sua maioria, é decorrente do uso imunossupressores, ou por infecções que comprometem a sua resposta imune, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou infecção pelo vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1). Nesses casos, o controle da taxa de autoinfecção pela resposta imune do hospedeiro é afetado, causando aumento crescente da carga parasitária, gerando graves sintomas respiratórios e intestinais, que são de difícil controle e podem ser fatais. Além disso, também pode ocorrer a disseminação do parasito por órgãos comumente não afetados, como sistema nervoso central, musculatura, entre outros, podendo ser responsável por quadros de sepses (MONTES *et al.*, 2010; TOLEDO, 2015, TEIXEIRA *et al.*, 2016).

De todo modo, fica evidente que a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro é determinante para o controle da estrogiloidíase e sobrevivência do parasito, influenciando diretamente a evolução do quadro clínico, bem como a eficácia dos possíveis testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico da infecção (TOLEDO *et al.*, 2015). A resposta imune induzida pelo hospedeiro frente a infecção por *Strongyloides*, é predominantemente do tipo 2, com participação do aumento de interleucinas (IL) 4, 5, 9, 13 e 33, que resulta no recrutamento e ativação de eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e macrófagos alternativamente ativados, aumento da produção de muco pelas células caliciformes localizadas na mucosa intestinal, e aumento da produção de IgE e IgG4. Esses elementos auxiliam no controle de larvas durante o processo de migração, na eliminação do parasito no intestino, e na

renovação do epitélio intestinal do hospedeiro (FINKELMAN *et al.*, 1997; LAWRENCE, 2003; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006; JENKINS; ALLEN 2010; BONNE-ANNÉE *et al.*, 2011; MARCOS *et al.*, 2011; ANURADHA *et al.*, 2015). Apesar dessa resposta imune ser essencial para o controle da infecção por *Strongyloides*, a indução de elementos da mesma, como aumento de eosinófilos circulantes, níveis séricos elevados de anticorpos reativos ao parasito, como IgE e IgG4, quando associados a dados clínicos e epidemiológicos apropriados, podem auxiliar no diagnóstico de infecção crônica assintomática (GROVE, 1996; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; SALVADOR *et al.*, 2014).

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase é baseado na observação de larvas do parasito, especialmente em amostras fecais; porém, atualmente não existe um teste de referência confiável que possa ser considerado “padrão-ouro” para o diagnóstico dessa infecção (SIDDIQUI; BERK, 2001; ARIFIN *et al.*, 2019). Os métodos parasitológicos de fezes em sua maioria apresentam baixa sensibilidade, pois a carga parasitária de grande parte dos infectados costuma ser baixa, em razão da pequena produção de ovos pelas fêmeas partenogenéticas. Com isso, as técnicas de concentração fundamentadas no hidro e termotropismo positivo larval, como a técnica de Baermann-Moraes e a técnica de Rugai, são as mais recomendadas e sensíveis para detecção da infecção por *S. stercoralis*; entretanto, ambas ainda apresentam suas limitações e atualmente não são empregadas como técnicas de diagnóstico de rotina em unidades de saúde em países endêmicos pela dificuldade de logística em trabalhar com grande número de amostras (BUONFRATE *et al.*, 2018; KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019; HAILU *et al.*, 2021). Por sua vez, os testes sorológicos têm sido utilizados como alternativa complementar ao diagnóstico parasitológico e são reconhecidos pela facilidade de aplicação, boa acurácia diagnóstica e alta sensibilidade e especificidade. Porém, apresentam alguns problemas devido à reações cruzadas com outros parasitos, incapacidade de diferenciar infecção atual e passada e reatividade persistente após o tratamento; destaca-se também a dificuldade de obtenção de número suficiente de larvas para a produção de antígeno (REQUENA-MENDEZ *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2016; ARIFIN *et al.*, 2019).

Dado o exposto, percebe-se que o principal obstáculo para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes para a estrogiloidíase humana, reside especialmente na ausência de métodos diagnósticos com boa sensibilidade e/ou de

um método de diagnóstico padrão de referência para detecção da infecção. Dessa forma, se torna necessário a padronização e validação de metodologias mais sensíveis no diagnóstico dessa parasitose, com aplicabilidade para uso em campo e que possam ser utilizadas em áreas endêmicas onde os indivíduos apresentam baixa carga, como tem sido observado em vários estudos de populações que residem nessas regiões endêmicas. Logo, o presente estudo foi realizado em duas etapas, uma em modelo experimental e outra em população humana. No modelo experimental, utilizando diferentes períodos de infecção, diferentes cargas, e diferentes tratamentos, foi realizada a avaliação da eficácia e o aprimoramento de uma técnica parasitológica comumente utilizada. Nestes animais também foram avaliadas alterações leucocitárias e reatividade de diferentes subclasses de IgG frente à diferentes antígenos de *Strongyloides*. Posteriormente, as técnicas parasitológicas e imunológicas com melhor desempenho no modelo experimental foram selecionadas e utilizadas para avaliação da infecção por *S. stercoralis* na população humana de uma área localizada no município de Maceió, Alagoas, Brasil.

## ***2. REFERENCIAL TEÓRICO***

---

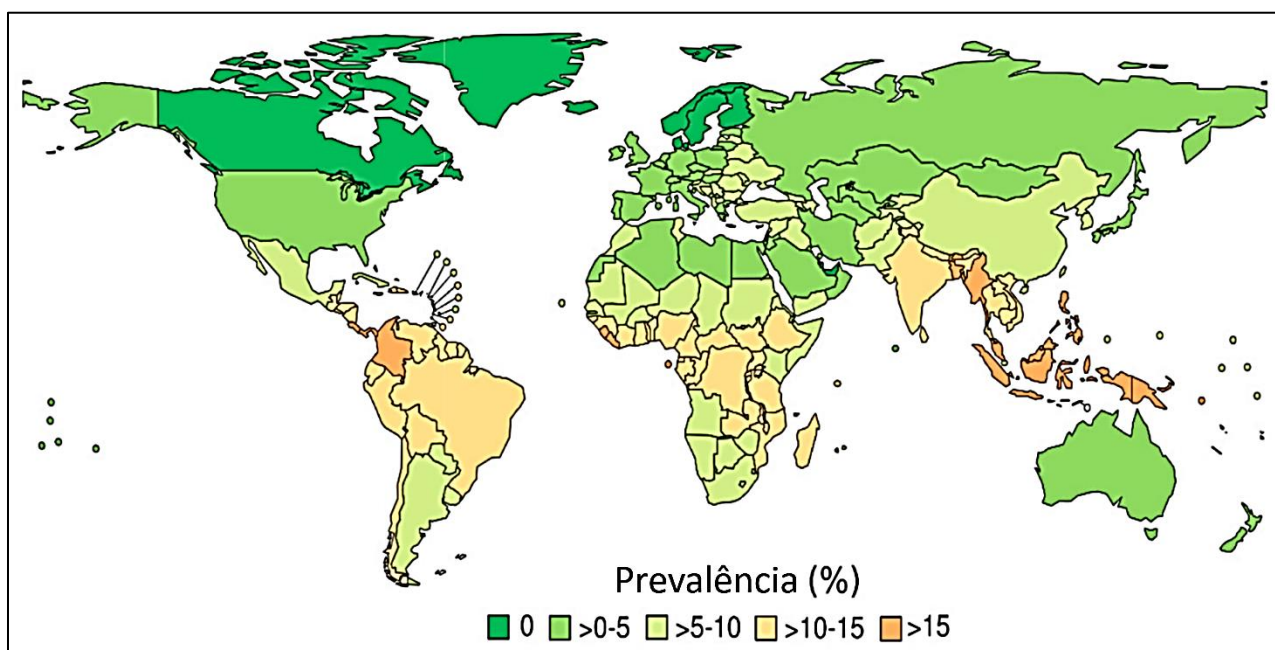
## 2.1 Epidemiologia da estrogiloidíase

As infecções causadas por nematódeos parasitos gastrintestinais estão entre as mais comuns em todo o mundo, afetando de forma desproporcional populações pobres, sem acesso à água, saneamento básico, educação adequada e oportunidades de desenvolvimento socioeconômico (MCCARTY *et al.*, 2014; WHO, 2023). Estima-se que mais de 1,5 bilhão de pessoas, ou 24% da população mundial, esteja infectada com uma ou mais espécies de nematódeos intestinais, como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis* (BETHONY *et al.*, 2006; LOZANO *et al.*, 2012; BARRY *et al.*, 2013; WHO, 2023). Essas espécies de nematódeos, por apresentarem ciclo de transmissão ligado ao solo, são classificados como geohelminhos ou helmintos transmitidos pelo solo (CHAN, 1997; HOTEZ *et al.*, 2008).

Dentre esses geohelminhos tem sido ressaltada a importância de *S. stercoralis*, principal espécie causadora da estrogiloidíase, uma infecção parasitária considerada a mais negligenciada das infecções helmínticas transmitidas pelo solo que acomete a população humana (OLSEN *et al.*, 2009; MONTES *et al.*, 2010; SCHÄR *et al.*, 2013a). A prevalência dessa infecção vem aumentando nos últimos anos, tanto em áreas endêmicas como em áreas não endêmicas, por conta dos problemas de diagnóstico, medidas sanitárias insatisfatórias, e falta de conhecimento sobre a doença nas populações de alto risco (PUTHIYAKUNNON *et al.*, 2014; ANDERSON *et al.*, 2014; PAGE; SPEARE, 2016).

A prevalência global da estrogiloidíase foi inicialmente estimada em 30 a 100 milhões de pessoas infectadas, estimativa esta citada pela maioria dos trabalhos subsequentes desde a sua publicação (BETHONY *et al.*, 2006); entretanto, esses números passaram a ser amplamente questionados dentro da comunidade científica como uma prevalência altamente subestimada que foi realizada com base em artigos de revisão publicados na década de 90, onde a prevalência de infecções parasitárias foi determinada por exames de fezes de rotina, sem utilizar técnicas de diagnóstico adequadas para *S. stercoralis* (GENTA, 1989; JORGENSEN *et al.*, 1996; BISOFFI *et al.*, 2013). Posteriormente, estudos realizados a partir do uso de técnicas parasitológicas mais específicas para detecção de *S. stercoralis*, ou que utilizaram a combinação dessas técnicas parasitológicas junto a ensaios imunológicos, estimaram que cerca de 370 milhões de pessoas estariam infectadas em todo o mundo

(BUONFRATE *et al.*, 2013; SCHÄR *et al.*, 2013a). Mais recentemente, Buonfrate e colaboradores (2020) realizaram uma modelagem estatística espaço-temporal, combinando levantamentos regionais de prevalência da infecção utilizando técnicas mais sensíveis associadas à variáveis e fatores que poderiam afetar os níveis de prevalência da estrogiloidíase em um país, tais como produto interno bruto per capita, escolaridade, população rural, saneamento básico, relevo do território, temperatura média anual e precipitação anual. Este estudo estimou que a estrogiloidíase pode afetar cerca de 600 milhões de pessoas, distribuídas por mais de 150 países, especialmente em áreas de clima quente e úmido do mundo (OLSEN *et al.*, 2009; WHO, 2023). Conforme demonstrado na **Figura 1**, a alta prevalência de *S. stercoralis* foi estimada para países localizados na Região do Sudeste Asiático (12,1%), na Região Africana (10,3%) e na Região das Américas (6,9%).



**Figura 1.** Prevalência global da estrogiloidíase estimada para 2017, conforme previsto por Buonfrate e colaboradores (2020).

Nas Américas, os países da América Central e da região norte da América do Sul tiveram as maiores prevalências, particularmente Panamá e Costa Rica ambas com 15,7%, e Colômbia com 18,4%. Na África, os países com estimativas de prevalência mais elevadas foram Serra Leoa (17%), Libéria (16%), e São Tomé e Príncipe (20,7%), enquanto que no Sudeste Asiático, todos os países apresentaram

altos níveis de prevalência, onde a mais alta estimada foi para Mianmar com 19,2%. Os países localizados em zonas temperadas do hemisfério Norte, como Canadá, Luxemburgo, Noruega, Irlanda e Reino Unido, onde a população apresenta elevado nível socioeconômico, a prevalência da estrogiloidíase é baixa, geralmente inferior a 0,1% (BUONFRATE *et al.*, 2020). Na América do Norte e em vários países da Europa, a maioria dos casos ativos de infecção por *Strongyloides* são reportados em imigrantes, refugiados e viajantes. Por exemplo, o Canadá relatou uma taxa de prevalência de 9 a 77% entre imigrantes e refugiados, principalmente do Sudeste Asiático, e a Espanha relatou estrogiloidíase como a infecção parasitária mais comum, detectada em 17,2% dos migrantes africanos (THOMPSON; BOGGILD, 2015; SALAS-CORONAS *et al.*, 2018). No entanto, em alguns países europeus, como Itália e França, a maioria dos casos de estrogiloidíase já relatados foram de infecção autóctone (MAGNAVAL *et al.*, 2000; OTTINO *et al.*, 2020).

Os dados da literatura colocam o Brasil como área endêmica para estrogiloidíase, mas a prevalência estimada da doença no país apresenta grande heterogeneidade de valores (SCHÄR *et al.*, 2013a; KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019). Paula e Costa-Cruz (2011) em um trabalho de revisão de literatura estimaram, com base em trabalhos publicados entre 1990 e 2009, que a prevalência média da estrogiloidíase no Brasil foi de 5,5%, caracterizando o país como uma área hiperendêmica. Entretanto, apontaram que distribuição da infecção pelo nematódeo entre as regiões brasileiras não é uniforme, tendo prevalência de 5,3% na região Norte, 7,9% no Nordeste, 6,6% no Centro-Oeste, 3,9% no Sudeste e 4,0% na região Sul (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Já o trabalho de Schär e colaboradores (2013a), que revisaram estudos de prevalência de estrogiloidíase realizados no país entre 1989 a 2011, estimaram que a prevalência de infecção atinge 13% da população geral do país, podendo atingir até 17% da população hospitalizada. Finalmente, os dados publicados por Buonfrate e colaboradores (2020) estimaram uma prevalência de infecção de 11,2% com variação entre 5,7% a 16,6% no Brasil.

Apesar da importância mundial e do grande impacto que a estrogiloidíase apresenta de maneira isolada ou como fator de risco para outras doenças, a grande dificuldade de apontar estimativas a respeito da sua prevalência tem sido associada principalmente à complexidade de desenvolvimento deste nematódeo, à dificuldade de diagnóstico clínico e à baixa sensibilidade dos testes laboratoriais (ARIFIN *et al.*, 2019; KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019).

## 2.2 Aspectos biológicos da infecção por *Strongyloides*

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* estão inseridos na Classe Chromadorea (=Secernenta), Subclasse Chromadoria, Ordem Rhabditida, Sub-Ordem Tylenchina e Família Strongyloididae (ADAMSOM, 1987; SCHMIDT; ROBERTS, 2009). Essa classificação é baseada em caracteres morfológicos associados à estudos filogenéticos utilizando análise de genes da subunidade do RNA ribossomal de mais de 300 espécies de nematódeos (BLAXTER *et al.*, 1998).

Dentre as mais de 50 espécies descritas para o gênero *Strongyloides*, somente duas foram naturalmente encontradas parasitando seres humanos: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. A espécie *S. fuelleborni*, que originalmente parasita primatas não humanos, tem sido responsável pela infecção humana apenas em habitantes de localizações geográficas restritas, localizadas na Papua Nova Guiné, Tailândia e Filipinas (SPEARE, 1989; SHIELD; KOW, 2013; THANCHOMNANG *et al.*, 2017). Já *S. stercoralis*, espécie responsável por quase a totalidade dos casos de infecção em humanos (KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019), foi descoberta pelo médico Louis Normand no Hospital Naval de Toulon, França, e descrita pelo farmacêutico Arthur R.J. Bavay, em 1876, nas fezes diarreicas de soldados franceses que voltaram do serviço militar na Cochinchina, sul do Vietnã. Bavay denominou a forma larval do nematódeo de *Anguillula stercoralis* que, em latim, “*Anguillula*” significa pequena enguia ou peixe longo e “*stercus*” por ser sinônimo de fezes. A espécie foi redescrita e renomeada por Stiles & Hassal, em 1902, sendo então denominada *Strongyloides stercoralis* (GROVE, 1996). No Brasil, a importância deste parasito como agente etiológico da estrogiloidíase foi primeiramente destacada por Ribeiro da Luz em 1880 e, mais à frente, por Lutz e Moraes (HUGGINS, 1971; COSTA-CRUZ, 2003).

As espécies do gênero *Strongyloides*, ao longo de seu ciclo de vida, apresentam alternância de gerações de vida livre, com formação de machos e fêmeas que se reproduzem sexuadamente no ambiente, e de vida parasitária, onde as fêmeas parasitam o intestino delgado do hospedeiro e formam larvas por partenogênese, uma característica diferenciada dos demais nematódeos parasitos (YAMADA *et al.*, 1991; VINEY; LOK, 2007; TOLEDO *et al.*, 2015). Os mecanismos responsáveis pela determinação do tipo de desenvolvimento das espécies desse gênero não estão completamente determinados, porém a maioria dos estudos indica que a



determinação sexual tem forte influência genética. No caso da espécie *Strongyloides ratti*, todas as formas evolutivas são diploides, sendo observado que as fêmeas apresentam seis cromossomos, dos quais 2 cromossomos são sexuais ( $2n=6$ , XX), e os machos apresentam 5 cromossomos, pois recebem apenas um dos cromossomos sexuais ( $2n=5$ , X0) (HARVEY; VINEY, 2001; STREIT, 2017). Nas fêmeas de *Strongyloides venezuelensis* (HINO *et al.*, 2014), *Strongyloides papillosus* (TRANTAPHYLLOU; MONCOL, 1977; ALBERTSON *et al.*, 1979), *Strongyloides vituli* (KULKARNI *et al.*, 2013) e *Strongyloides ransomi* (TRANTAPHYLLOU, MONCOL, 1977), o número de conjuntos cromossômicos diploides é quatro ( $2n = 4$ ), onde um dos pares tem o dobro de tamanho do outro. Foi verificado que nessas espécies, o tamanho do cromossomo maior se dá em razão do cromossomo sexual ter se fundido com um dos autossômicos (NEMETSCHKE *et al.*, 2010; HUNT *et al.*, 2016; STREIT, 2016). Embora sejam detectadas diferenças genéticas entre machos e fêmeas da maioria das espécies de *Strongyloides* avaliadas, a diferença de proporção na formação de machos e fêmeas, com a formação de um número muito superior de fêmeas que de machos, indica que fatores ambientais também participam no processo de definição sexual desses parasitos (STREIT, 2017).

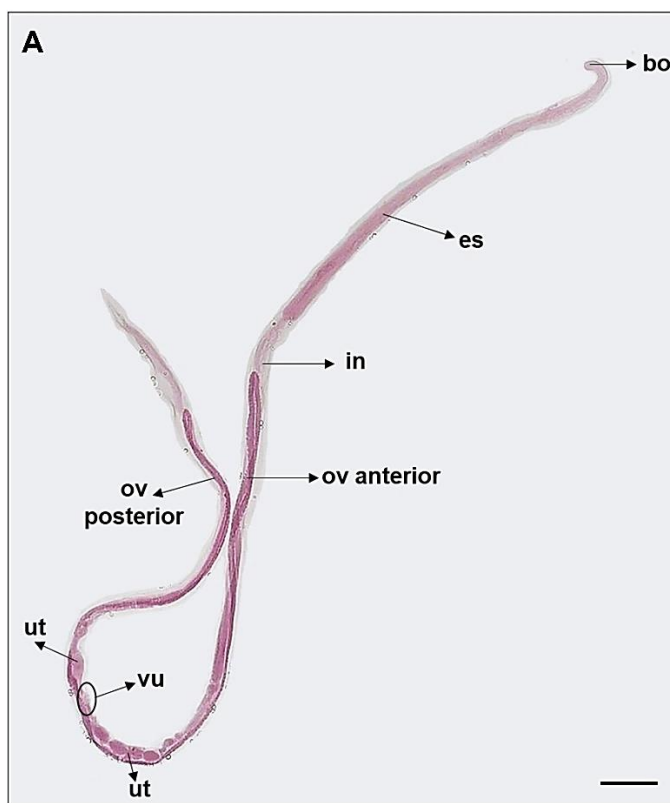
Em relação à diferenciação entre fêmeas de vida livre ou parasitária, dados experimentais têm demonstrado que fatores como resposta imune do hospedeiro, disponibilidade de nutrientes e temperatura ambiental são determinantes neste processo (VINEY, 1999; VINEY; LOK, 2007). Viney (1996) destacou a importância da temperatura na determinação do ciclo de vida livre, evidenciando que larvas de *S. ratti* se desenvolvem preferencialmente em fêmeas de vida livre em ambientes com temperaturas mais altas em relação a temperatura do hospedeiro que a liberou. Outros estudos demonstraram que, além da temperatura, algumas espécies de *Strongyloides* aumentam o número de gerações de vida livre após infectarem uma espécie de hospedeiro diferente do natural, sugerindo que a imunidade do hospedeiro interfere nesse processo de diferenciação sexual (STREIT, 2008). Estudos mais recentes relataram que fatores ambientais influenciam na diferenciação de fêmeas de vida livre ou parasitária através de uma expressão genica diferenciada. A exposição de ovos e larvas do parasito às condições ambientais mais adequadas ao seu desenvolvimento estimulam a produção de uma classe de hormônio esteroide, denominado de ácido dafacrônico (DAs), que se liga ao receptor nuclear (DAF-12) regulando a expressão de genes que permite a continuidade do desenvolvimento de

*S. stercoralis*. Assim, quando DA é produzido, as larvas se desenvolvem e evoluem até a fase adulta; porém, na ausência da produção de DA, a via de ativação DA/DAF-12 não é ativada e as larvas não continuam seu desenvolvimento, permanecendo como larvas filarióides infectantes (ALBARQI *et al.*, 2016).

A ocorrência de alternância de gerações de vida livre e parasitária observada durante o desenvolvimento de espécies de *Strongyloides* resulta na formação de formas evolutivas bem distintas, como fêmea partenogenética parasita, fêmea e macho de vida livre, ovos e larvas rabditoide e filarióide (TOLEDO *et al.*, 2015; VINEY; LOK, 2015).

As fêmeas parasitas partenogenéticas de *S. stercoralis* (**Figura 2**) medem em torno de 2,1 a 2,7 mm de comprimento, tendo 30 a 40 µm de diâmetro e são caracterizadas por possuírem esôfago filiforme longo (um terço do comprimento do corpo) com uma cauda pontiaguda romba (SPEARE, 1989). São parasitos que se acomodam, principalmente, na submucosa do intestino delgado anterior (duodeno e jejuno superior), mas podem se estender para outras regiões do trato gastrointestinal, e também podem ser encontradas livremente no intestino e nas fezes em casos graves de infecção. As fêmeas parasitas adultas chegam a produzir em torno de 30 a 50 ovos ao dia por partenogênese e podem viver até cinco anos (WILKES *et al.*, 2004; TOLEDO *et al.*, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

As fêmeas e os machos de vida livre são menores, medindo em torno de 1 a 1,2 mm de comprimento e 50 a 85 µm de largura, sendo as fêmeas ligeiramente maiores que os machos. Ambos os sexos apresentam esôfago rabditoide. As fêmeas são robustas com um ovário do tipo didelfo e uma vulva no ponto médio do corpo, enquanto os machos possuem duas espículas simples e um gubernáculo, que são exteriorizados através da cloaca que se abre próximo à extremidade posterior da cauda pontiaguda curvada ventralmente (SPEARE, 1989; COSTA-CRUZ, 2016).



**Figura 2.** Fotomicrografia da fêmea parasita partenogenética de *Strongyloides*. bo= boca; es= esôfago; in= intestino; ov= ovário; ut= útero; vu= vulva. (barra = 80 $\mu$ m).

**Fonte:** acervo do autor.

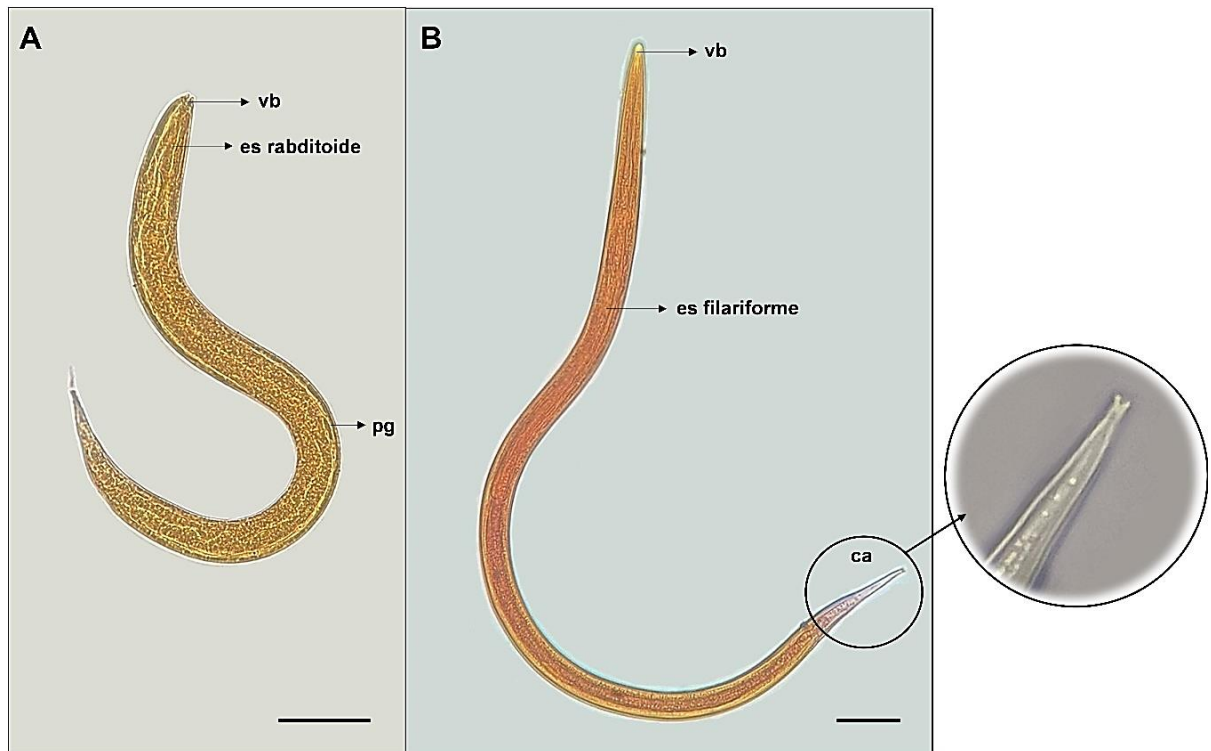
Os ovos são elípticos com parede fina e transparente, medindo 40 a 85  $\mu$ m de comprimento por 30 e 34  $\mu$ m de largura, sendo encontrados parcialmente embrionados no estágio de desenvolvimento de duas a oito células (**Figura 3A**) ou já contendo uma larva (**Figura 3B**). Os ovos das fêmeas parasitas e de vida livre são semelhantes, porém os da fêmea parasita da espécie *S. stercoralis* raramente podem ser evidenciados nas fezes, pois eclodem nas criptas de Lieberkuhn presentes na parede intestinal do hospedeiro, sendo encontrados somente em raros casos de diarreia (COSTA-CRUZ, 2016; TOBAR *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Fotomicrografia do ovo embrionado (A) e larvado (B) de *Strongyloides*. (barra = 50 $\mu$ m). **Fonte:** acervo do autor.

As larvas rabditoides ( $L_1$  e  $L_2$ ) apresentam formato arredondado na extremidade anterior, esôfago rabditiforme ocupando o terço anterior do corpo, seguido pelo intestino que termina no ânus que se abre na região subterminal da larva. Não são relatadas diferenças significativas entre larvas  $L_1$  derivadas de fêmeas de vida livre ou parasitas. Essas larvas medem cerca de 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 15 a 17  $\mu$ m de largura, possuem cutícula fina e hialina, vestíbulo bucal curto, diferentemente das larvas de ancilostomídeos (vestíbulo bucal longo), e apresentam primórdio genital nítido, característica que também as difere das larvas de ancilostomídeos (TOLEDO *et al.*, 2015; TOBAR *et al.*, 2021) (**Figura 4A**).

As larvas filarioides ( $L_3$ ) apresentam extremidade anterior arredondada e um esôfago longo do tipo filariforme, que corresponde à metade de seu tamanho. Em geral, medem cerca de 0,35 a 0,60 mm de comprimento por 15 a 18  $\mu$ m de largura, possuem vestíbulo bucal curto e intestino terminado em ânus, sendo que a porção posterior se afina gradualmente e termina em duas pontas (cauda bifurcada), característica essa que permite fácil diagnóstico em relação a outros nematódeos que podem contaminar amostras fecais. Essas larvas são as formas infectantes do parasito, podendo ser encontradas tanto no meio ambiente, provenientes de adultos de vida livre ou parasitos (responsáveis por infecções externas), quanto evoluir no interior do hospedeiro infectado, gerando as autoinfecções internas (BRIGANDI *et al.*, 1997; COSTA-CRUZ, 2016; TOBAR *et al.*, 2021) (**Figura 4B**).



**Figura 4.** Fotomicrografia dos estágios larvais de *Strongyloides*. **A.** larva rabditoide, notar o vestibulo bucal curto (vb), o esôfago (es) rabditoide e o primórdio genital nítido (pg). **B.** Larva filarioide, notar esôfago longo filariforme e a cauda bifurcada (ca). (barra = 30 $\mu$ m). **Fonte:** acervo do autor.

### 2.2.1 Ciclo de desenvolvimento de *S. stercoralis*

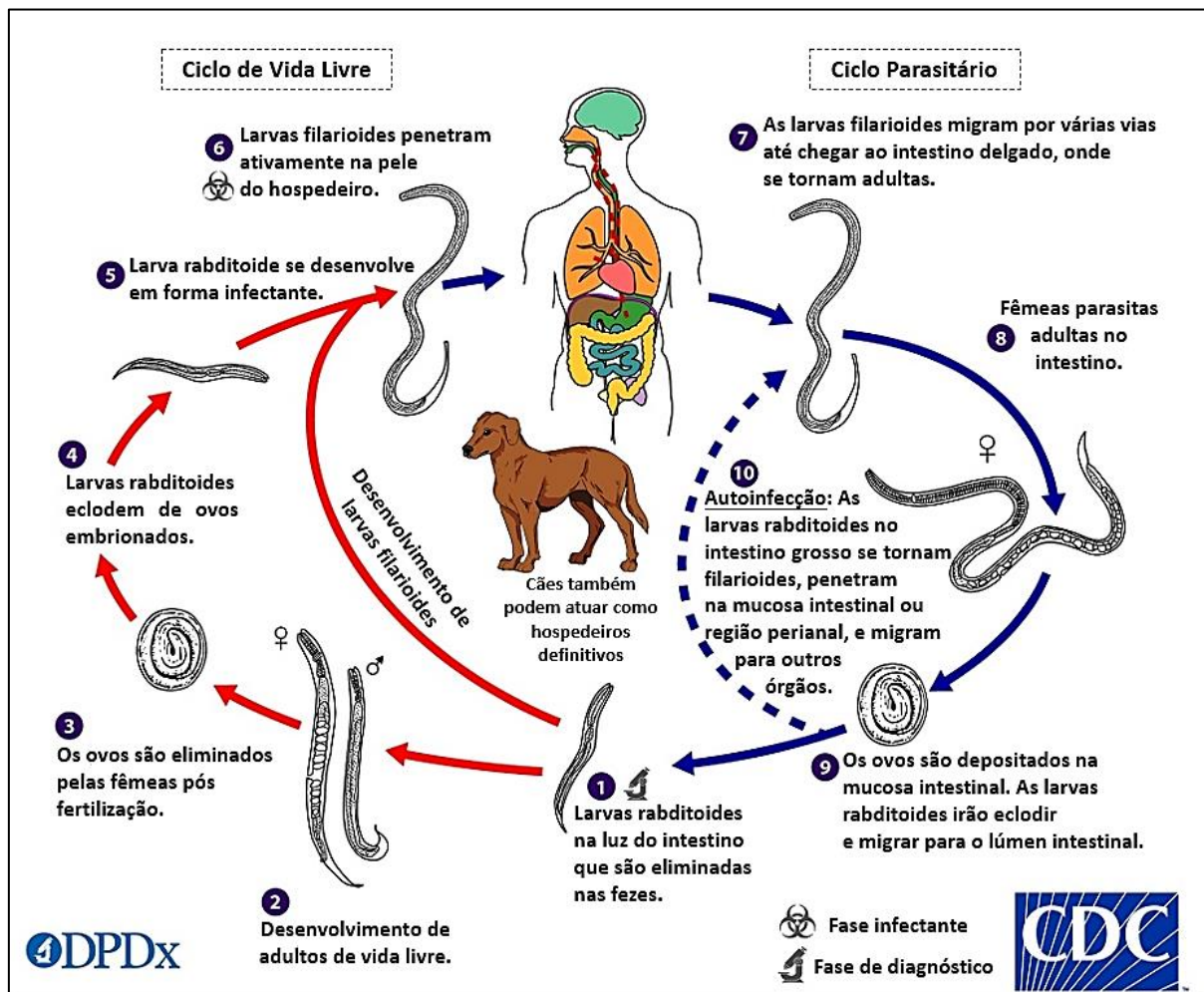
Conforme ilustrado na **Figura 5**, as larvas filarioides ou de 3<sup>o</sup> estágio (L<sub>3</sub>) de *S. stercoralis*, derivadas de desenvolvimento direto ou indireto, infectam seu hospedeiro por penetração ativa no tegumento (pele, mucosa oral ou esofágica). Essas larvas secretam proteases que as auxiliam na penetração e na migração através dos tecidos até alcançarem a circulação sanguínea ou linfática, sendo passivamente conduzidas para o coração e os pulmões. Ao atingirem os capilares pulmonares, as larvas filarióides saem para os alvéolos, ascendem à árvore brônquica até a laringe sendo então expelidas pela expectoração ou deglutidas, atingindo a porção proximal do intestino delgado do hospedeiro, onde se estabelecem. Após penetrarem na mucosa do intestino delgado, as larvas sofrem mais duas mudas até completarem o seu desenvolvimento em fêmeas adultas. Quando sexualmente maduras, essas fêmeas fazem a postura de um pequeno número de ovos formados por partenogênese, ou seja, sem a presença de machos (PUTHIYAKUNNON *et al.*,

2014; VINEY; LOK, 2015; BRELOER; ABRAHAM, 2017). Desses ovos eclodem, ainda no intestino delgado do hospedeiro humano, larvas rabditóides de 1º estágio (L<sub>1</sub>), cuja maioria são eliminadas junto às fezes. Porém, uma pequena parte das larvas L<sub>1</sub> podem evoluir para o estágio L<sub>3</sub> ainda no intestino e penetrar na porção distal do intestino grosso, reto ou mesmo região perianal, reinfectando o mesmo hospedeiro. Este processo é conhecido como autoinfecção interna ou externa e tem sido descrito somente na infecção humana por *S. stercoralis*, o que permite que indivíduos permaneçam infectados por longos períodos de tempo por esse parasito, mesmo sem reexposição à áreas contaminadas (GROVE; NORTHERN, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

Parte das larvas L<sub>1</sub> eliminadas juntamente com as fezes do hospedeiro para o ambiente podem evoluir para vermes adultos, machos e fêmeas de vida livre, que se reproduzem, dando origem à geração de vida livre alternada à de vida parasitária (ciclo heterogônico ou indireto), responsável pelo aumento da contaminação ambiental. Estudos sugerem, para a espécie *S. stercoralis*, a existência de apenas uma geração de vida livre, onde as larvas originadas pela reprodução sexuada evoluem em larvas filarióides infectantes que precisam penetrar no hospedeiro suscetível completando o ciclo heterogônico do desenvolvimento deste nematódeo (SCHAD *et al.*, 1989; YAMADA *et al.*, 1991; VINEY; LOK, 2007). Outras espécies desse gênero, como o *S. fuelleborni*, podem apresentar consecutivas gerações de vida livre, sob determinadas condições de cultura; no entanto, ainda não se sabe se esse é um fenômeno dependente de condições laboratoriais específicas ou que ocorre na natureza (STREIT, 2008).

É importante salientar que cães domésticos, canídeos silvestres e possivelmente gatos podem se infectar por *S. stercoralis*, contribuindo assim para a contaminação ambiental (TRAVERSA *et al.*, 2010; THAMSBORG *et al.*, 2017; PARADIES *et al.*, 2023). A prevalência de *S. stercoralis* em cães tem variado de 0 a mais de 50%, onde a maioria dos estudos demonstra que cães jovens apresentam maior probabilidade de serem infectados (JÚNIOR *et al.*, 2006; PALMER *et al.*, 2008; DAGMAWI *et al.*, 2012; RIGGIO *et al.*, 2013). Quanto ao potencial zoonótico, já foi demonstrado que cães domésticos podem apresentar infecção por duas populações genéticas de *S. stercoralis*, onde uma população parece ser específica para esses canídeos, mas a outra é compartilhada com seres humanos (JALETA *et al.*, 2017; THAMSBORG *et al.*, 2017). Os gatos domésticos são experimentalmente suscetíveis

a infecções por *S. stercoralis*, mas não há relatos sobre seu potencial como reservatório natural (THAMSBORG *et al.*, 2017; WULCAN *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis*. Fonte: adaptado de CDC (2019).

A espécie *S. venezuelensis*, que naturalmente parasita roedores, tem sido comumente utilizada como modelo experimental para estudos de aspectos da estrogiloidíase humana, tais como biologia molecular, interação parasito-hospedeiro e fonte de antígenos para padronização de novas técnicas no imunodiagnóstico (HASEGAWA *et al.*, 1988; TAIRA *et al.*, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012a). As larvas filarioides de *S. venezuelensis* possuem rota de migração semelhante às larvas de *S. stercoralis* em humanos, penetrando na pele de ratos ou camundongos e realizando migração para os pulmões via corrente sanguínea e/ou tecidos subcutâneos e musculares, e 36h pós-infecção saem do pulmão gradualmente, passando através da traqueia, esôfago e estômago até

atingirem o intestino delgado, se instalando na porção inicial do duodeno (NEGRÃO-CORRÊA, 1990; TAKAMURE, 1995). Entre o 5º ao 7º dia de infecção, maior quantidade de fêmeas adultas partenogênicas encontra-se na mucosa do intestino delgado, produzindo grande parte dos ovos que serão expelidos juntos às fezes do hospedeiro (NEGRÃO-CORRÊA, 1990; TAKAMURE, 1995).

Apesar das semelhanças, a infecção por *S. venezuelensis* apresenta algumas importantes diferenças no desenvolvimento, o que limita os estudos de diagnóstico e morbidade neste modelo experimental (SATO; TOMA, 1990; NEGRÃO-CORRÊA, 1990). Diferente de *S. stercoralis* em humanos, roedores infectados por *S. venezuelensis* eliminam ovos, e não larvas, não permitindo a ocorrência de autoinfecção interna dos hospedeiros e, conseqüentemente, roedores não apresentam quadros de hiperinfecção e disseminação, sendo a infecção espontaneamente eliminada em tempos variados dependendo da espécie do hospedeiro. Em camundongos, a infecção por *S. venezuelensis* apresenta um quadro agudo com auto cura após 10-14 dias (SATO; TOMA, 1990), enquanto que ratos permanecem infectados por 30 a 45 dias e gerbils por até 570 dias (BAEK *et al.*, 2003). Como a infecção por *S. venezuelensis* em camundongos tem um quadro extremamente agudo, estes hospedeiros não são os mais adequados para identificação de antígenos e anticorpos que possam ser utilizados em possíveis testes sorológicos para diagnóstico da estrogiloidíase. Nesse caso, ratos podem ser utilizados como melhor modelo para esse tipo de abordagem devido a fácil obtenção e manutenção em laboratório, bom rendimento larval em culturas de fezes para obtenção de antígenos heterólogos, menor risco de infecção durante a manipulação desse modelo e uma permanência mais longa de infecção, características que podem auxiliar numa melhor avaliação sobre a eficiência de diferentes técnicas de diagnóstico e sobre aspectos e alterações imunológicas associadas à estrogiloidíase (TAKAMURE, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2010; MARRA *et al.*, 2010).

### **2.3 Aspectos patológicos e imunológicos da infecção por *Strongyloides***

A evolução clínica da estrogiloidíase humana é bastante variada e diretamente relacionada a fatores que são essenciais nesse processo, tais como a carga parasitária, estado nutricional do hospedeiro, intensidade e tipo da resposta



imunológica induzida frente a infecção (CONCHA *et al.*, 2005; FARDET *et al.*, 2007; OLSEN *et al.*, 2009). Estudos indicam que alguns indivíduos de áreas endêmicas são reativos ao parasito, mas não apresentam infecção ativa, sugerindo que houve exposição e cura espontânea. Por sua vez, a maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos, apresentam baixa carga parasitária e a infecção pode se prolongar por várias décadas devido ao fenômeno de autoinfecção (VADLAMUDI *et al.*, 2006; MARCOS *et al.*, 2008). Apesar da estrogiloidíase ser assintomática na maioria dos indivíduos imunocompetentes, 75% das pessoas infectadas apresentam eosinofilia periférica e níveis séricos aumentados de imunoglobulina-E (IgE) (NUTMAN, 2007).

Indivíduos infectados sintomáticos podem apresentar diferentes formas clínicas: aguda, crônica e manifestações graves (VADLAMUDI *et al.*, 2006). As manifestações agudas estão associadas ao período pré-patente, que ocorre desde a penetração e migração de larvas infectantes até a produção de novas larvas por uma fêmea adulta parasita (FREEDMAN, 1991). Nesse período, geralmente são sintomas genéricos que não permitem um diagnóstico específico, relacionado à migração das larvas, como edema localizado na pele ou urticária, que pode durar até 3 semanas; presença de tosse seca e dispneia, podendo ocorrer também pneumonia eosinofílica (Síndrome de Löeffler), sintomas esses associados à passagem das larvas pelos pulmões; os sintomas gastrointestinais estão relacionados a presença dos vermes adultos e eliminação das larvas, como inchaço e dores abdominais, náusea, alternância de períodos de constipação e diarreia e prurido anal (SIDDIQUI; BERK, 2003; VADLAMUDI *et al.*, 2006; RAMANATHAN *et al.*, 2008). Uma vez iniciada a produção de larvas pelas fêmeas adultas recém-estabelecidas, novos ciclos de infecção podem ser iniciados por autoinfecção interna e, conseqüentemente, dando início a fase crônica da estrogiloidíase (GROVE, 1996; GAUS *et al.*, 2011).

Frequentemente, a fase crônica da estrogiloidíase é assintomática ou levemente sintomática, afetando principalmente o trato gastrointestinal e a pele, com sintomas inespecíficos de intensidade leve ou moderada, sem permitir um diagnóstico preciso para essa parasitose (CONCHA *et al.*, 2005; VADLAMUDI *et al.*, 2006). Nessa fase os indivíduos podem permanecer infectados por anos ou décadas na ausência de reinfecção externa devido ao mecanismo de autoinfecção do parasito (SIDDIQUI; BERK, 2001; PRENDKI *et al.*, 2011). Dentre as manifestações dermatológicas, a mais comum é uma erupção urticariforme inespecífica, com a presença de pústulas ou erupções estacionárias particularmente ao redor da cintura e nas nádegas, com

duração de 1 a 2 dias (GROVE, 1996) e também “larva currens”, definida como estrias lineares pruriginosas resultantes da migração das larvas através dos tecidos subcutâneos. A velocidade de movimento dessa larva (até 10 centímetros por hora), bem como sua localização, geralmente nas nádegas, virilha, abdômen e tronco, são características da estrogiloidíase, que em raros casos auxiliam no diagnóstico (GROVE, 1996; PICHARD *et al.*, 2014). Ainda nessa fase, algumas manifestações clínicas incomuns sem prevalência significativa foram evidenciadas em diferentes estudos, como obstrução duodenal (FRIEDENBERG *et al.*, 1999; HINDY *et al.*, 2011), íleo paralítico (NONAKA *et al.*, 1998), apendicite (LAMPS, 2010), artrite reativa (RICHTER *et al.*, 2006), asma recorrente (SEN *et al.*, 1995; KUZUCU, 2006), lesões hepáticas focais (GULBAS *et al.*, 2004), má absorção crônica (ATUL *et al.*, 2005) e síndrome nefrótica (WONG *et al.*, 1998; COPELOVITCH *et al.*, 2010).

Casos sintomáticos com manifestações graves, como hiperinfecção e/ou disseminação do parasito ocorrem em 1,5 a 2,5% dos pacientes infectados, geralmente associados a pacientes que apresentam algum tipo de imunossupressão, e que estão associados a altas taxas de mortalidade (85 a 100% dos casos) do hospedeiro (MILDER *et al.*, 1981; MEJIA; NUTMAN, 2012). Nestes indivíduos, a taxa de autoinfecção é acelerada devido a uma alteração nos mecanismos imunológicos do hospedeiro que controlam a infecção, gerando a síndrome de hiperinfecção com aumento crescente da carga parasitária e, conseqüentemente, graves sintomas pulmonares e gastrointestinais, acompanhados pela detecção de um número acentuado de larvas nas fezes e/ou expectoração (KEISER; NUTMAN, 2004; TOLEDO *et al.*, 2015). Em alguns indivíduos também pode ocorrer a infecção disseminada, causada por larvas que migram do pulmão e do trato gastrointestinal para outros órgãos, como fígado, coração, rins, ductos linfáticos e sistema nervoso central, podendo ser responsável por quadros de sepse (MONTES *et al.*, 2010; ALTINTOP *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2015, TEIXEIRA *et al.*, 2016).

As condições específicas sob as quais as manifestações graves da estrogiloidíase se desenvolvem não são totalmente esclarecidas (VASQUEZ-RIOS *et al.*, 2019). Todavia, há certos fatores que estão relacionados a indução de uma imunossupressão, alterando os mecanismos reguladores da imunidade do hospedeiro e colocando-o em risco para o desenvolvimento de sintomas extremamente graves. Alguns desses fatores são uso de corticosteróides (MARCOS *et al.*, 2011), infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) (BARROS *et al.*, 2012;

BARROS; MONTES, 2014), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SIEGEL; SIMON, 2012; SALVADOR *et al.*, 2013), desnutrição extrema (FORRER *et al.*, 2017), alcoolismo (TEIXEIRA *et al.*, 2016) e indivíduos submetidos a transplantes de órgãos (AL MALKI; SONG, 2016).

Embora seja evidente que a resposta imune desempenhe papel importante no controle da estrogiloidíase, ainda temos lacunas sobre sua atuação no controle da autoinfecção devido à dificuldade de realizar trabalhos com o parasito em humanos ou outros primatas (TOLEDO *et al.*, 2015). Todavia, assim como em outras infecções ocasionadas por nematódeos intestinais, a infecção por *Strongyloides* no homem e em modelos experimentais é predominantemente caracterizada por uma resposta imune do tipo-2, a qual estimula a produção de interleucinas (IL) 4, 5, 9 e 13, com consequente aumento nos níveis de IgE e IgG4 em humanos (ou IgG1 em camundongos), ativação de eosinófilos e mastócitos e produção de muco pelas células caliciformes localizadas no epitélio superficial da mucosa (FINKELMAN *et al.*, 1997; LAWRENCE, 2003; BONNE-ANNÉE *et al.*, 2011; MARCOS *et al.*, 2011; ANURADHA *et al.*, 2015).

A participação da resposta imune do tipo-2 no mecanismo de controle da infecção por *Strongyloides* foi confirmada em estudos de infecção experimental, utilizando *S. venezuelensis* em camundongos geneticamente deficientes no receptor de IL-4 e no fator de transcrição induzido por esta via (IL-4R $\alpha$ -/- ou STAT6-/-), não permitindo a indução da resposta do tipo-2, resultando assim em um grande retardo no período de eliminação dos vermes quando comparado ao período de eliminação da infecção em camundongos selvagens e demonstrando a importância dessa resposta para o controle da infecção (SASAKI *et al.*, 2005; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2006). Além disso, estudos que avaliaram infecção concomitante de *S. stercoralis* com outros patógenos em humanos, demonstraram que as respostas Th2 são essenciais para prevenir manifestações graves ou hiperinfecção por *S. stercoralis* (PORTO *et al.*, 2001; IRIEMENAM *et al.*, 2010). Por exemplo, a coinfeção de *S. stercoralis* com HTLV-1 está amplamente associada ao desenvolvimento de sintomas graves e disseminação de *S. stercoralis*, pois indivíduos infectados com HTLV-1 apresentam um número elevado de células T reguladoras circulantes, o que desregula a resposta Th2, alterando o equilíbrio imunológico necessário à erradicação e/ou controle eficiente do parasito (BARROS *et al.*, 2012; BARROS; MONTES, 2014). O vírus HTLV-1 também está associado a uma resposta que auxilia o aumento de citocinas Th1,

favorecendo o aumento da carga parasitária pela redução dos níveis de IL-5, eosinófilos e de outros elementos da resposta Th2 (MONTES *et al.*, 2009).

Entre os elementos da resposta imune do tipo-2, os eosinófilos têm sido positivamente associados ao controle da infecção por *Strongyloides*. Rotman e colaboradores (1996) demonstraram que os eosinófilos são as principais células efetoras responsáveis pela morte de larvas de *S. stercoralis* experimentalmente transferidas para a cavidade peritoneal de camundongos previamente imunizados. Posteriormente, Herbert e colaboradores (2000), realizando infecção experimental em camundongos deficientes e transgênicos para IL-5, relataram que a redução do número larvas de *S. stercoralis*, tanto na infecção primária como secundária, estava associada ao aumento de eosinófilos, o que não se observou nos animais deficientes. Camundongos transgênicos para IL-5 e infectados com *S. venezuelensis* também foram capazes de eliminar mais rapidamente um grande número de larvas durante a migração tecidual, e de vermes adultos cirurgicamente transplantados no intestino delgado (EL-MALKY *et al.*, 2003). Além disso, a ação direta de eosinófilos também foi avaliada utilizando camundongos com deleção da região de alta afinidade do promotor GATA-1 (camundongos  $\Delta dbpGATA^{-/-}$ ), fator de transcrição essencial para diferenciação final de eosinófilos (YU *et al.*, 2002). Nesse modelo experimental foi demonstrado que a ausência de eosinófilos durante a infecção por *S. venezuelensis* resulta no aumento da carga parasitária e retardo na eliminação dos vermes intestinais (PEREIRA, 2008).

A ativação de eosinófilos por citocinas, imunoglobulinas e complemento pode resultar na secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e TGF $\beta$ . Estas moléculas podem regular a permeabilidade vascular e modular o tráfego celular, a secreção de muco e a contração do músculo liso (MIR *et al.*, 2006; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Eosinófilos ativados também podem liberar grânulos citotóxicos contendo proteína básica principal (MBP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica de eosinófilos (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). A liberação desses grânulos induz a hipercontratibilidade da musculatura intestinal que contribui para bloquear a invasão da mucosa intestinal por vermes adultos de *S. venezuelensis* em camundongos (EL-MALKY *et al.*, 2003; ROTHENBERG; HOGAN, 2006; BRELOER; ABRAHAM, 2017). Além disso, estudo *in vitro* utilizando grânulos de eosinófilos humanos contra *S. stercoralis* demonstrou que a morte das larvas é dependente de MBP e não EPO (O'CONNELL *et al.*, 2011).

A degranulação do eosinófilo pode ser induzida por ativação do complemento e/ou, em uma fase mais tardia da infecção ou na reinfecção, através do processo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) (ROTHENBERG; HOGAN, 2006; BRELOER; ABRAHAM, 2017). Além da participação direta no mecanismo de destruição do parasito, Padigel e colaboradores (2006) demonstraram que eosinófilos isolados de camundongos e estimulados *in vitro* com antígeno solúvel de *S. stercoralis* aumentam a expressão de CD69 (molécula marcadora da ativação de eosinófilos), CD86 (molécula co-estimulatória para ativação de linfócitos T) e de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Esses eosinófilos ativados, quando co-cultivados com células T CD4+ *naive* estimulam estes linfócitos a produzir IL-5, indicando que eosinófilos possam atuar como células apresentadoras de antígeno (APC) auxiliando na indução de respostas imunes Th2 primárias e secundárias frente a *S. stercoralis* (PADIGEL *et al.*, 2006; PADIGEL *et al.*, 2007a).

Assim como os eosinófilos, os neutrófilos também atuam durante a infecção contra larvas de *S. stercoralis* (BONNE-ANNÉE *et al.*, 2011). A prova de que esses granulócitos apresentam a capacidade de eliminar as larvas de *S. stercoralis* foi demonstrada a partir de estudo experimental, em que neutrófilos purificados foram inseridos juntamente com larvas dentro de câmaras de difusão e implantados em camundongos para avaliar potencial dessas células na eliminação das larvas. Os neutrófilos quando implantados em camundongos sem deficiência mataram as larvas através do mecanismo dependente da proteína granular mieloperoxidase (MPO) (GALIOTO *et al.*, 2006; O'CONNELL *et al.*, 2011). Todavia, em camundongos deficientes na expressão de CXCR2, receptor essencial para recrutamento de neutrófilos, a eliminação das larvas foi significativamente reduzida (GALIOTO *et al.*, 2006). Padigel e colaboradores (2007b) também relataram a importância dos neutrófilos na morte das larvas de *S. stercoralis* utilizando camundongos deficientes de *Gai2*, proteína necessária para sinalização do recrutamento de neutrófilos. O bloqueio dessa via inibiu a migração celular e recrutamento desse granulócito para locais de infecção, reduzindo a capacidade do hospedeiro em eliminar as larvas do parasito.

Em relação ao papel dos mastócitos no controle da infecção por *Strongyloides*, há evidências experimentais indicando que os mastócitos são células efetoras essenciais para a expulsão de vermes adultos de *S. ratti* e *S. venezuelensis* da mucosa intestinal de camundongos infectados (BRELOER; ABRAHAM, 2017).

Estudos experimentais utilizando *S. ratti* (NAWA *et al.*, 1985) e *S. venezuelensis* (KHAN *et al.*, 1993) em camundongos com mutação no receptor Kit (WBB6F1-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup>), congenitamente deficientes em mastócitos, observaram um atraso na expulsão desses parasitos e aumento na produção de ovos e/ou larvas L<sub>1</sub> nas fezes. E para demonstrar que a contribuição dos mastócitos para a imunidade intestinal é essencial na eliminação desses parasitos, os autores realizaram transferência de células da medula óssea de camundongos sem deficiência para camundongos W/W<sup>v</sup>, resultando em restabelecimento da mastocitose intestinal induzida pela infecção experimental por *S. ratti* e *S. venezuelensis* e restauração do processo de eliminação dos vermes adultos (NAWA *et al.*, 1985; KHAN *et al.*, 1993). No estudo experimental realizado por Araújo (2014) utilizando *S. venezuelensis* em camundongos Kit<sup>W-sh</sup> (SH), que não diferenciam mastócitos, demonstrou que a mastocitose apresenta papel fundamental na resposta imune adquirida atuando como processo efetor no controle e resolução da infecção intestinal. Além do mais, outra evidência da importância dos mastócitos no mecanismo de controle e expulsão de *Strongyloides* foi demonstrada pelo atraso na eliminação de *S. ratti* em camundongos deficientes em mastócitos de mucosa (Cpa3Cre) (BRELOER; ABRAHAM, 2017; REITZ *et al.*, 2017).

A ativação de mastócitos acontece principalmente através da ligação cruzada de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI), por processo de ADCC, que induz a liberação de mediadores lipídicos como Prostaglandinas D2 e E2, Leucotrienos C4 e B4, secreção de citocinas como IL-4, IL-13, IL-3, IL-5 GM-CSF e TNF-α e liberação de mediadores inflamatórios como heparina e histamina. Essas moléculas, além de atuarem diretamente sobre o verme, induzem modificações fisiológicas no hospedeiro, tais como aumento de permeabilidade, de motilidade da mucosa intestinal e infiltração de células que podem atuar na eliminação do parasito (MURPHY *et al.*, 2010; MIGALOVICH-SHEIKHET *et al.*, 2012; GRI *et al.*, 2012). Os mastócitos ativados durante infecções por nematódeos gastrintestinais também podem secretar proteoglicanas fortemente sulfatadas que impediriam a fixação dos vermes no epitélio da mucosa intestinal e, conseqüentemente facilitariam a eliminação dos mesmos (MARUYAMA; NAWA, 1997; MARUYAMA *et al.*, 1998; MARUYAMA *et al.*, 2000; MARUYAMA *et al.*, 2003). Outro processo semelhante também pode ocorrer com a secreção de mucinas sulfatadas produzidas por células caliciformes durante a infecção (ISHIKAWA *et al.*, 1995; MARUYAMA *et al.*, 2003).

Em concordância com os achados experimentais, um trabalho realizado com

população humana avaliando o plasma de indivíduos infectados por *S. stercoralis* evidenciou um aumento significativo de mediadores característicos de grânulos de eosinófilos (como proteína catiônica de eosinófilos, neurotoxina derivada de eosinófilo, peroxidase de eosinófilo e proteína básica majoritária de eosinófilos), de neutrófilos (elastase, mieloperoxidase) e de mastócitos (triptase de mastócitos, leucotrieno C4 e carboxipeptidase-A3) quando comparados aos indivíduos não infectados, sendo observada redução significativa da concentração destes mediadores no plasma após tratamento anti-helmíntico, sugerindo a participação destes granulócitos na resposta imune induzida pelo nematódeo também em humanos (RAJAMANICKAM *et al.*, 2018).

Além da participação dos elementos da resposta imune já mencionados, também foi demonstrado que a resposta humoral apresenta papel importante no controle da infecção por *Strongyloides*, pois camundongos deficientes em linfócitos B apresentaram aumento da carga parasitária (EL-MALKY *et al.*, 2013) e atraso na expulsão de vermes adultos de *S. venezuelensis* (ESCHENAZI, 2013). Desse modo, a participação de anticorpos na resposta imune protetora desenvolvida contra nematódeos parasitos tem sido sugerida pela frequente elevação de anticorpos durante as infecções, principalmente IgE e IgG1 (em camundongos) ou IgG4 (para humanos) (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013). Especificamente na infecção produzida por *Strongyloides*, Fernandes e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos Balb/c reinfetados por *S. venezuelensis* produzem imunidade protetora que resulta na eliminação precoce (7 dias) de vermes adultos em infecção realizada tanto aos 15 como 45 dias após a infecção primária. Os autores, nesse mesmo estudo, ainda mostraram níveis elevados de IgE e IgG no início da reexposição ao parasito. Nesse sentido, Matsumoto e colaboradores (2013) mostraram que IgE e IgG exercem efeitos colaborativos na expulsão de *S. venezuelensis*, uma vez que na ausência dessas imunoglobulinas, camundongos infectados apresentaram atraso na eliminação do verme. Contudo, ao realizarem a transferência de IgG e IgE do soro de animais infectados pelo nematódeo, restaurou a capacidade de eliminação do verme através da ativação de mastócitos via receptores FcγRIII e FcεRI, respectivamente.

Anticorpos da classe IgG são os mais abundantes durante a infecção por *S. stercoralis*, sendo observado níveis elevados em 95% dos pacientes infectados (LINDO; LEE, 2001). Por outro lado, também é relatado que ocorre uma redução significativa nos níveis de IgG em indivíduos com estrongiloidíase grave e co-

infectados com HTLV-1 quando comparados aos níveis de indivíduos com infecções assintomáticas ou sintomáticas leves, sugerindo a influência desse anticorpo nos mecanismos de proteção contra *S. stercoralis* (PORTO *et al.*, 2001; IRIEMENAM *et al.*, 2010). Ligas e colaboradores (2003) sugeriram que à medida que a resposta imune contra larvas de *S. stercoralis* amadurece, o hospedeiro desenvolve uma resposta protetora de IgG que precisa da ativação de complemento, recrutamento de neutrófilos e receptor FcR $\gamma$  para funcionar. Esse mecanismo de proteção resulta na morte das larvas por meio de um mecanismo de ADCC, pelo qual neutrófilos irão se ligar à porção Fc do anticorpo que está ligado à superfície do parasito. Com isso, para matar as larvas, os neutrófilos podem então liberar uma das muitas moléculas tóxicas que eles contêm (MATSUMOTO *et al.*, 2013).

O anticorpo IgE também é um constituinte importante da resposta imune protetora do hospedeiro contra os parasitos helmínticos que são endêmicos na maior parte da população mundial (ARIFIN *et al.*, 2019). A produção de IgE, induzida durante a infecção por helmintos parasitos, leva a desgranulação e liberação de mediadores solúveis por mastócitos e basófilos, como histamina, heparina, citocinas e proteases (SCHWARTZ, 1994). Também pode mediar o processo de ADCC em eosinófilos, que tem sido associada à destruição de larvas de helmintos (GOUNNI *et al.*, 1994). Embora o aumento de IgE seja proporcionalmente maior do que o atingido pelos demais isotipos, os níveis séricos desse anticorpo ainda são baixos quando comparados aos níveis de IgG. Além do mais, apenas uma pequena proporção de toda a IgE sérica produzida durante uma infecção helmíntica é parasito específica (TURNER *et al.*, 1979), pois a capacidade dos alérgenos ambientais comuns de estimular respostas de IgE e produzir sintomas alérgicos pode ofuscar quaisquer respostas de IgE anti-helmínticas existentes (VERCELLI *et al.*, 1998). O anticorpo IgA, mais frequentemente encontrado em mucosas e secreções, apresenta importante papel mediador na infecção por *Strongyloides*, sendo capaz de modular a resposta responsável pela inibição da fecundidade do parasito e eliminação de vermes adultos (ATKINS *et al.*, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2012b).

Além da produção de subclasses de imunoglobulinas relacionadas à resposta do tipo 2, a imunoglobulina IgM, associada a resposta inata, também se apresenta elevada em infecções por nematódeos (IRIEMENAM *et al.*, 2010). O anticorpo IgM tem sido descrito como importante na resposta imune protetora contra *Strongyloides*, reconhecendo diferentes antígenos e utilizando diferentes mecanismos de morte



associados a ativação do complemento e recrutamento de eosinófilos e neutrófilos (HERBERT *et al.*, 2000; LIGAS *et al.*, 2003; ARIFIN *et al.*, 2019). A produção desse anticorpo durante a infecção por *Strongyloides* é realizada a partir de células B-1 (HERBERT *et al.*, 2002; LIGAS *et al.*, 2003). Eschenazi (2013) evidenciou que camundongos C57 $\mu$ MT<sup>-/-</sup>, deficientes na produção de IgM, quando infectados com *S. venezuelensis*, tiveram atraso na eliminação do parasito em infecção primária e secundária. No entanto, apesar do atraso no controle da infecção, os camundongos foram capazes de eliminar a infecção, sugerindo que a produção de IgM participa dos mecanismos de controle da infecção por *Strongyloides*, mas não é essencial para eliminação do parasito.

Como exposto, a resposta imune do tipo-2 é essencial para controle da estrogiloidíase, e a indução de elementos presentes nessa resposta, como aumento de eosinófilos circulantes e elevados níveis séricos de anticorpos reativos ao parasito, podem auxiliar no diagnóstico da infecção, principalmente em indivíduos imunocompetentes e assintomáticos.

## 2.4 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase não é realizado na maioria dos casos, pois a doença é frequentemente assintomática, ou quando apresenta sintomatologia, as alterações são inespecíficas (SIDDIQUI; BERK, 2001; CONCHA *et al.*, 2005; SCHÄR *et al.*, 2014). O diagnóstico definitivo dessa parasitose baseia-se na detecção de larvas do parasito em fezes, fluidos corporais ou amostras de tecido; entretanto, a grande maioria dos indivíduos infectados apresenta baixa carga parasitária e as fêmeas do parasito produzem pequeno número de larvas que são eliminadas de forma esporádica e intermitente nas fezes, dificultando o diagnóstico (SIDDIQUI; BERK, 2001; ARIFIN *et al.*, 2019). A identificação dos casos crônicos assintomáticos de *S. stercoralis* é primordial e visa diminuir uma possível evolução para casos graves e fatais que podem acontecer devido ao processo de autoinfecção descontrolado que ocorre em indivíduos infectados e imunossuprimidos. Em virtude disso, é necessária a realização de exames parasitológicos e imunológicos e/ou moleculares complementares para confirmação do diagnóstico (MOGHADDASSANI *et al.*, 2011; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013; BUONFRATE *et al.*, 2015a).

### 2.4.1 Métodos Parasitológicos

Os métodos parasitológicos de fezes utilizados em diagnósticos de rotina, como esfregaço direto, sedimentação espontânea, concentração em formol-éter e método de Kato-Katz (SIDDQUI; BERK, 2001) apresentam baixa sensibilidade para detecção de larvas de *Strongyloides*, tendo cerca de 30% de sensibilidade quando analisada uma única amostra de fezes, 50% com análise de três amostras e superior a 90% com análise de sete ou mais amostras de fezes em dias alternados (KIM *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2004; LAU *et al.*, 2004). Todavia, em razão da dificuldade de obtenção de um grande número de amostras fecais do mesmo indivíduo, diagnósticos falso-negativos para esta infecção são frequentes (SEGARRA- NEWNHAM, 2007). Com a finalidade de aumentar a sensibilidade dos exames parasitológicos na detecção de *S. stercoralis* têm sido utilizados métodos parasitológicos para a concentração de larvas do parasito, como a técnica de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e a técnica de Rugai (RUGAI *et al.*, 1954). Ambas as técnicas de concentração são fundamentadas no hidro e termotropismo positivo larval, utilizam uma amostra maior de fezes (aproximadamente 10-15 gramas), e são técnicas mais indicadas para a detecção de larvas; porém, é necessária a utilização de fezes frescas (RUGAI *et al.*, 1954; SIDDQUI; BERK, 2001; REQUENA-MENDEZ *et al.*, 2013; HAILU *et al.*, 2022). Embora a técnica de Baermann seja a mais utilizada para confirmação da estrogiloidíase em estudos epidemiológicos e ensaios clínicos, por ser uma técnica trabalhosa e menos econômica, não está disponível na maioria dos laboratórios de rotina (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013; GELAYE *et al.*, 2021). A técnica de Rugai por sua vez, utilizando apenas um copo cônico, gazes e uma pipeta, apresenta mesma sensibilidade da técnica clássica de Baermann, e uma logística mais viável de ser aplicada em áreas endêmicas (RUGAI *et al.*, 1954).

Os métodos de coprocultura, principalmente a técnica de cultura em placa de Ágar (KOGA *et al.*, 1991) e de cultura e concentração em papel de filtro (HARADA; MORI, 1955) também têm sido usados como uma abordagem diagnóstica de maior sensibilidade, pois possibilita o desenvolvimento do parasito por simulação de requisitos climáticos naturais e físico-químicos e melhor visualização do parasito durante a análise; entretanto, são métodos que examinam pequenas quantidades de fezes e envolvem maior custo e tempo para obtenção de resultados (KOZUBSKY; ARCELLI, 2004; LUNA *et al.*, 2007; VINEY; LOK, 2015; TOLEDO *et al.*, 2015).

Apesar de tudo, dentre as técnicas parasitológicas, a técnica de Baermann-Moraes e cultura em placa de Ágar, quando realizadas em três amostras fecais, apresentam melhor sensibilidade e eficácia no diagnóstico de *S. stercoralis* (CAMPO POLANCO *et al.*, 2014). Na maioria dos estudos, a sensibilidade de ambas as técnicas tem se mostrado semelhante e significativamente maior que na sedimentação espontânea (TELLO *et al.*, 2012), técnica de Kato-Katz (MACHICADO *et al.*, 2012) e concentração em formol-éter (ARAKAKI *et al.*, 1990; MANDONG; MADAKI, 2005). Entretanto, alguns estudos indicam que a técnica de cultura em placa de Ágar é ligeiramente menos sensível que a de Baermann-Moraes (STEINMANN *et al.*, 2007; KNOPP *et al.*, 2008), enquanto outros a consideram mais sensível (POCATERRA *et al.*, 2017; KRISTANTI *et al.*, 2018; FORMENTI *et al.*, 2019; KAEWRAT *et al.*, 2020). A combinação dos dois métodos é a melhor abordagem para diagnosticar *S. stercoralis*, inclusive, apresentando uma maior sensibilidade que a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (CHANKONGSIN *et al.*, 2020). Todavia, atualmente não são utilizadas como técnicas de diagnóstico de rotina em unidades de saúde em países endêmicos (HAILU *et al.*, 2020; HAILU *et al.*, 2021).

Devido à dificuldade de realização de exame parasitológico único e sensível para o diagnóstico da estrogiloidíase, técnicas moleculares e/ou imunológicas têm sido utilizadas para complementar o diagnóstico dessa parasitose, superando a baixa sensibilidade dos exames de fezes (BUONFRATE *et al.*, 2015a).

#### 2.4.2 Métodos Moleculares

O uso de métodos moleculares empregados no diagnóstico dessa parasitose tem se apresentado cada vez mais promissor e sua utilização para confirmação de diagnóstico tem aumentado nas duas últimas décadas (DACAL *et al.*, 2020). As técnicas moleculares são confiáveis e utilizam apenas uma pequena quantidade de DNA extraída de amostras de fezes. São ensaios que foram desenvolvidos como formas alternativas de detectar diretamente a presença de *Strongyloides* sp, seja em amostras refrigeradas, congeladas ou conservadas, facilitando o transporte das mesmas para o laboratório (WATTS *et al.*, 2016; BALACHANDRA *et al.*, 2020). Além disso, abrangem a detecção de múltiplas infecções e podem ser realizados de forma rápida e precisa quando o método encontra-se padronizado e validado (INCANI *et al.*, 2016; LLEWELLYN *et al.*, 2016). Dentre as técnicas moleculares de amplificação de

DNA, as mais utilizadas são a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR), PCR em tempo real (qPCR) e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (MEJIA *et al.*, 2013; WATTS *et al.*, 2014; O'CONNELL *et al.*, 2016).

No entanto, ainda que a utilização das técnicas moleculares seja apontada como altamente específica e sensível na detecção de *S. stercoralis*, variação de sensibilidade entre diferentes estudos dificulta a aplicação como um método de escolha para o diagnóstico da estrogiloidíase (TEN HOVE *et al.*, 2009; VERWEIJ *et al.*, 2009; KRAMMER *et al.*, 2011). Por exemplo, em uma revisão sistemática sobre testes moleculares na detecção de *Strongyloides* em comparação com os métodos parasitológicos, a sensibilidade da PCR convencional ou em tempo real foi de 71,8% e 64,4%, respectivamente, e com redução para 61,8% e 56,5% quando a sorologia foi adicionada entre os testes de referência (BUONFRATE *et al.*, 2018). Estudos comparando a detecção parasitológica de *S. stercoralis* em relação à sensibilidade de testes moleculares demonstraram que a PCR em tempo real variou de 75 a 100% (VERWEIJ *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2015; CAMPO-POLANCO *et al.*, 2018) e a PCR convencional entre 76 a 100% (PAULA *et al.*, 2015; BOSQUI *et al.*, 2018b; AL-MEKHLAFI *et al.*, 2019).

Parte da variação na sensibilidade desses métodos moleculares ocorre pela falta de técnicas padronizadas e de diferentes métodos de extração de DNA, além do período de tempo em que as amostras de fezes ficam armazenadas (congeladas ou em etanol) antes da extração (SCHÄR *et al.*, 2013b; SULTANA *et al.*, 2013). Além disso, outras limitações dessas técnicas estão na presença de inibidores de reação e de nucleases no material fecal (SHARIFDINI *et al.*, 2015; BUONFRATE *et al.*, 2018; KROLEWIECKI *et al.*, 2018), na necessidade da utilização de reagentes caros e instalações especializadas e que geralmente são confinadas a laboratórios bem equipados (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; BALACHANDRA *et al.*, 2020). Por essas desvantagens, tem-se sugerido que a detecção molecular no diagnóstico da estrogiloidíase seja mais adequada como teste de confirmação, mas não para fins de triagem, e que ainda são necessários estudos para avaliar melhor o seu desempenho em trabalho campo (BUONFRATE *et al.*, 2018).

### 2.4.3 Métodos Imunológicos

As técnicas sorológicas têm sido utilizadas pela sua facilidade de aplicação,

boa acurácia diagnóstica e altos valores de sensibilidade e especificidade (MOGHADDASSANI *et al.*, 2011; REQUENA-MENDEZ *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2016). Se baseiam na medição de uma resposta de diferentes anticorpos (IgG, IgA, IgM ou IgE) que reagem aos extratos ou frações proteicas antigênicas obtidas do parasito (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; TOLEDO *et al.*, 2015). Esses anticorpos podem ser quantificados principalmente no soro dos pacientes (KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019), embora tenha relatos da detecção de IgG e IgA parasito-específico em amostras de leite materno (MOTA-FERREIRA *et al.*, 2009) urina (EAMUDOMKARN *et al.*, 2018) e saliva (BOSQUI *et al.*, 2015) de indivíduos com estrogiloidíase, ainda há necessidade de padronização e mais estudos a respeito dos métodos realizados nessas amostras biológicas (BOSQUI *et al.*, 2018a).

Entre os testes imunológicos, o ensaio de ELISA é o mais importante e o mais utilizado para no diagnóstico da estrogiloidíase, pela simplicidade de aplicação da técnica, baixo custo, testagem em grande número de amostras, uso de diferentes antígenos e anticorpos e pela alta sensibilidade e especificidade (BUONFRATE *et al.*, 2015a, 2015b; ARIFIN *et al.*, 2019; KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019). A técnica de RIFI também é empregada para triagem e diagnóstico individual da estrogiloidíase, utilizando como antígeno suspensão ou corte de larvas na pesquisa de anticorpos em amostras de soros (MOTA-FERREIRA *et al.*, 2009; TAMAROZZI *et al.*, 2021). Outro importante método alternativo utilizado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase é o *Western Blotting*, técnica de alta especificidade com reduzida reatividade cruzada que realiza a identificação de frações antigênicas detectadas de forma específica por anticorpos presentes em amostras de indivíduos infectados (SILVA *et al.*, 2003). Dessas frações antigênicas, estudos têm relatado que bandas proteicas de 25 a 45 kDa foram especificamente reconhecidas por anticorpos IgG em amostras de indivíduos com estrogiloidíase (CONWAY *et al.*, 1993; SUDRÉ *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008; FELICIANO *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2020) e que podem ser utilizadas como futuras ferramentas para diagnóstico dessa parasitose (FONSECA *et al.*, 2020). A produção de diferentes classes e/ou subclasses de anticorpos durante a infecção por *S. stercoralis* podem e/ou têm sido utilizados como alvo no diagnóstico dessa parasitose (ATKINS *et al.*, 1997, 1999; TOLEDO *et al.*, 2015). IgM é a primeira imunoglobulina que pode ser detectada no soro, pois sua produção durante a infecção geralmente apresenta níveis séricos elevados durante a infecção aguda, mostrando um pico após uma semana de infecção e podendo permanecer elevada por duas a

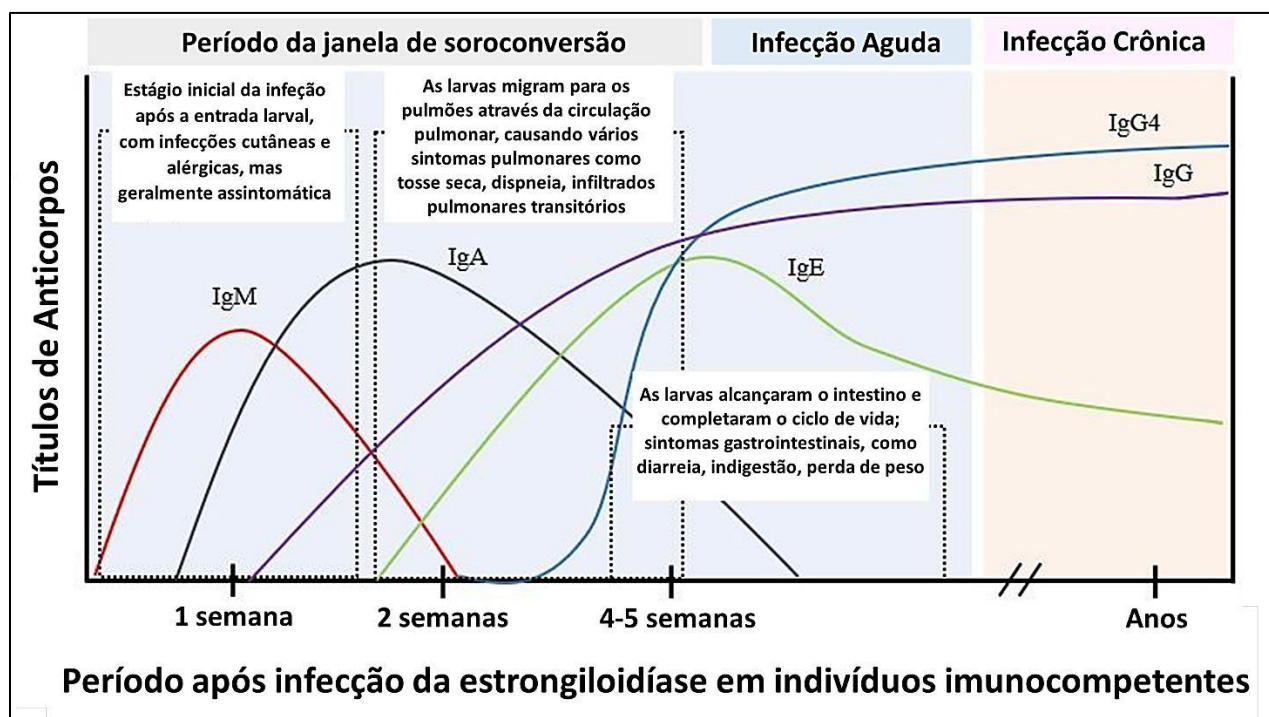
três semanas (**Figura 6**) (GROVE, 1996; PORTO *et al.*, 2001; MARCOS *et al.*, 2008). Os dados de reatividade de IgM em amostras de soro de pacientes cronicamente infectados por *S. stercoralis* têm sido menos consistentes (TOLEDO *et al.*, 2015). Além disso, os testes de diagnóstico baseado em IgM anti-*Strongyloides* estão disponíveis apenas para uso em pesquisa, mas não para utilização em procedimentos de diagnóstico (ABCAM, 2019). O anticorpo IgA pode ser detectado tanto no soro de indivíduos infectados com estrogiloidíase como também em outras amostras, incluindo saliva ou leite materno (GENTA *et al.*, 1987; COSTA *et al.*, 2003; MOTA-FERREIRA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010). O isotipo IgA apresenta pico de produção no início da segunda semana de infecção, permanecendo elevado até a quinta semana (ARIFIN *et al.*, 2019) (**Figura 6**) e pode ser usado para detecção da infecção em indivíduos copronegativos (ATKINS *et al.*, 1999). Bosqui e colaboradores (2015) mostraram que IgA antígeno-específica no soro de pacientes com estrogiloidíase tem detecção limitada, mas sugeriram que é mais facilmente detectável na saliva. Todavia, amostras salivares são mais difíceis de preservar e armazenar em comparação com as amostras de sangue (GONÇALVES *et al.*, 2012b).

Os níveis de IgE antígeno-específica durante infecções helmínticas compõem aproximadamente 10% do IgE total no soro (JARRETT; MILLER, 1982). Na infecção por *S. stercoralis*, pacientes imunocompetentes apresentam níveis séricos de IgE elevados entre duas a cinco semanas após infecção (**Figura 6**); entretanto, esse aumento não é detectado em casos de hiperinfecção ou pacientes imunocomprometidos, sugerindo que a gravidade da doença nesses casos pode estar relacionada com a redução desse anticorpo (PORTO *et al.*, 2005; RAMANATHAN; NUTMAN, 2008; TOLEDO *et al.*, 2015). Em pacientes cronicamente infectados por *S. stercoralis*, a produção dos níveis de IgE também tem uma redução significativa, dificultando seu uso para um teste de diagnóstico (RODRIGUES *et al.*, 2007). Semelhante à IgA, a elevação de IgE também foi expressiva em indivíduos copronegativos, sugerindo o papel desse anticorpo no controle da infecção e da produção larval (ATKINS *et al.*, 1999). Além do mais, o aumento sérico de IgE e do número de eosinófilos, em conjunto a contextos clínicos e epidemiológicos apropriados, tem auxiliado indiretamente no diagnóstico da estrogiloidíase. A contagem de eosinófilos tem sido cada vez mais estudada e aplicada nesse contexto, pois a estrogiloidíase é frequentemente incluída no diagnóstico diferencial quando a eosinofilia é encontrada como um achado acidental

ou como parte da avaliação de populações especiais, como imigrantes, refugiados ou viajantes retornando com febre de regiões onde o parasito é endêmico (CHECKLEY *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2014; THWAITES *et al.*, 2017).

Dentre todas as classes de anticorpos, IgG é a mais utilizada para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase, provavelmente porque é a classe de imunoglobulina circulante mais abundante (MARCOS *et al.*, 2011; ARIFIN *et al.*, 2018; FRADEJAS *et al.*, 2018; BOONROUMKAEW *et al.*, 2020). Em pacientes infectados por *S. stercoralis*, esse anticorpo costuma ser detectado em altos níveis após a sexta semana de infecção, permanecendo elevado durante toda infecção (**Figura 6**) (IRIEMENAM *et al.*, 2010). Embora a detecção de anticorpos IgG circulantes ter sido fundamental para o sorodiagnóstico da estrogiloidíase por muitos anos, seu uso tem sido limitado pela elevada frequência de reações cruzadas com outros helmintos e pela persistência de altos níveis séricos após a cura, dificultando a distinção entre infecções ativas e passadas (LINDO; LEE, 2001; VAN DOORN *et al.*, 2007; ARIFIN *et al.*, 2019).

Quanto aos subtipos de IgG, a produção de IgG1 é estimulada no início da infecção por *S. stercoralis*, apresentando níveis elevados em indivíduos mais jovens quando comparados a indivíduos mais velhos (ATKINS *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2007). O subtipo IgG2 apresenta níveis significativamente mais elevados em indivíduos imunocompetentes quando comparados a indivíduos imunossuprimidos (IRIEMENAM *et al.*, 2010), enquanto IgG3 geralmente é detectado em menores níveis, justamente por apresentar uma vida útil circulante mais curta, de apenas sete a nove dias, não sendo adequado em estudos com aplicações clínicas (HO; GIBALDI, 2003). Anticorpos do subtipo IgG4, em particular, têm sido estudados porque são estimulados durante infecções helmínticas, incluindo a estrogiloidíase humana (DE SOUZA *et al.*, 2020). IgG4 pode ser detectado duas semanas após a infecção e pode persistir por até 20 semanas (**Figura 6**) (ARIFIN *et al.*, 2019). Alguns trabalhos têm sugerido que os níveis de IgG4 foram mais elevados em indivíduos com estrogiloidíase tratados e não curados, indicando que o aumento acentuado dos níveis desse anticorpo específico para *S. stercoralis* está associado com resistência ao tratamento (SATOH *et al.*, 1999 e 2004; NORSYAHIDA *et al.*, 2013). Embora IgG4 seja demonstrado como uma marca de cronicidade, estudos avaliando seu potencial no diagnóstico da estrogiloidíase ainda é escasso (ARIFIN *et al.*, 2019).



**Figura 6.** Ilustração hipotética dos títulos de diferentes isotipos de imunoglobulinas durante o curso da infecção por estrogiloidíase em indivíduos imunocompetentes.

**Fonte:** Adaptado de Arifin e colaboradores (2019).

Apesar dos testes sorológicos serem ferramentas extremamente promissoras no diagnóstico da estrogiloidíase, apresentam algumas limitações, como reatividade cruzada com outras infecções helmínticas, menor sensibilidade em pacientes com neoplasias hematológicas ou infecção por HTLV-1, não permite estimar a carga parasitaria e incapacidade de diferenciar entre infecção atual e passada (RAMACHANDRAN *et al.*, 1998; KROLEWIECKI *et al.*, 2010; PAK *et al.*, 2014). Outra limitação dos testes sorológicos está relacionada com a dificuldade de obtenção de quantidades suficientes de larvas de *S. stercoralis* para a produção e fracionamento de antígenos (KOOSHA *et al.*, 2004). Dessa maneira, vários trabalhos têm utilizado outras espécies heterólogas, incluindo *S. ratti*, *S. venezuelensis* e *S. cebus*, como fonte de antígenos. Essas espécies têm sido usadas principalmente pela quantidade obtida através de infecções experimentais, por não apresentarem riscos de contaminação para quem as manipula e por demonstrarem grandes taxas de reatividade cruzada com a espécie homóloga (BAILEY *et al.*, 1989; TOLEDO *et al.*, 2015; DONG *et al.*, 2016; ARIFIN *et al.*, 2019). Alguns estudos têm relatado grandes variações de sensibilidade (56 a 100%) e especificidade (29 a 100%) nos testes sorológicos que utilizaram antígenos heterólogos. Entretanto, relacionaram essas falhas à falta de



padronização do método, obtenção do antígeno, isotipo de anticorpo testado, população de estudo e método de referência utilizado (CORRAL *et al.*, 2015a; FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2016; CORRAL *et al.*, 2019; ARIFIN *et al.*, 2019). Os extratos antigênicos preparados com a espécie *S. venezuelensis* foram os que apresentaram melhores resultados de sensibilidade (60 a 92%) e especificidade (77 a 99%) em relação às outras espécies heterólogas, sendo que a eficácia do diagnóstico foi semelhante à obtida utilizando antígeno homólogo (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; EAMUDOMKARN *et al.*, 2015; KALANTARI *et al.*, 2020).

Estudos que avaliam testes imunodiagnósticos como alternativa para o diagnóstico da estrogiloidíase têm utilizado diferentes fases evolutivas do parasito e formas de preparação de antígenos heterólogos. As larvas filarióides do parasito têm sido a principal fonte antigênica para os testes imunológicos, especialmente pela facilidade de obtenção desse estágio do parasito (GONÇALVES *et al.*, 2012a; GONÇALVES *et al.*, 2016; KALANTARI *et al.*, 2020). Dentre as diferentes preparações desse antígeno, temos a fração detergente antigênica, onde o extrato total é submetido à separação de proteínas utilizando Triton X-114 (DA SILVA *et al.*, 2014); o antígeno excretado/secretado, no qual o parasito fica em contato com meio de cultura (CUNHA *et al.*, 2017); a utilização de frações de membrana, obtidas a partir da ressuspensão em SDS e aquecimento do pellet do antígeno total do parasito (CORRAL *et al.*, 2015b); e a mais a comumente realizada, o extrato salino total, sendo considerada uma promissora fonte de antígenos na detecção de infecção por *S. stercoralis* (RIGO *et al.*, 2008; FELICIANO *et al.*, 2010; GONZAGA *et al.*, 2011; CORRAL *et al.*, 2015c). A utilização de extratos antigênicos salinos nos testes de diagnóstico utilizando amostras de soro selecionadas tem apresentado grandes variações de sensibilidade (50 a 95%) e especificidade (73 a 97%); no entanto, a sua performance ainda carece de avaliação em áreas endêmicas (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2016). Outro estágio evolutivo utilizado no preparo de extratos antigênicos são as fêmeas parasitas que, embora apresentem menor desempenho em termos de sensibilidade e especificidade, também é aplicado como alternativa em algumas áreas e laboratórios (GOULART DE CARVALHO *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Entre alguns dos testes sorológicos comercialmente disponíveis para diagnóstico da estrogiloidíase estão os kits de ELISA que empregam antígenos somáticos de *S. ratti*, como Bordier-ELISA (Bordier Affinity Products SA, Suíça) e

*Strongyloides*-ELISA (Scimedx Corporation, EUA). O desempenho diagnóstico desses ensaios comerciais foi avaliado em amostras selecionadas de pacientes de países da Europa, apresentando sensibilidade e especificidade média variando entre 67,5 a 98,3% e 87,3 a 100,00%, respectivamente (BISOFFI *et al.*, 2014; ARIFIN *et al.*, 2019). Já o kit comercial NIE-ELISA IgG (NovaLisa; NovaTec Immunodiagnostica, Dietzenbach, Alemanha), que utiliza um antígeno recombinante de larvas filarioides de *Strongyloides*, apresentou sensibilidade e especificidade que variou entre 72,3% a 78,9% e 85,1% a 93,6%, respectivamente; no entanto, também foi validado com soros selecionados de pacientes de países não endêmicos para estrogiloidíase (RAVI *et al.*, 2002; BUONFRATE *et al.*, 2015b; FRADEJAS *et al.*, 2018). Com isso, apesar desses kits diagnósticos para *S. stercoralis* estarem comercialmente disponíveis, estudos sugerem que a investigação em áreas endêmicas, onde a reinfecção pode ser um problema, ainda é necessária; além disso, são testes que foram padronizados e testados com pacientes de áreas não endêmicas (VAN DOORN *et al.*, 2007; BISOFFI *et al.*, 2014; BUONFRATE *et al.*, 2015b).

De modo de geral, nenhum dos testes diagnósticos disponíveis pode ser considerado como padrão-ouro para o diagnóstico da estrogiloidíase, seja pela baixa sensibilidade dos testes e/ou pela dificuldade de sua aplicabilidade no campo. Com isso, a gravidade dessa parasitose e os constantes relatos que essa tem sido amplamente subestimada, aumenta a necessidade de estudos mais amplos que apontem melhores estratégias de diagnóstico. Aliado a isso, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu metas e planos priorizando os esforços de controle contra a estrogiloidíase até 2030, implicando especialmente o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, mais sensíveis e específicos, e fáceis de usar para mapeamento e vigilância dessa parasitose (WHO, 2020). Com isso, este trabalho visa aprimorar e caracterizar a eficácia da utilização de técnicas parasitológicas e imunológicas para estrogiloidíase utilizando infecção experimental em ratos e amostras de população humana de área endêmica.

### **3. *JUSTIFICATIVA***

---

---

A estrogiloidíase é uma das helmintíases mais negligenciadas da atualidade que, devido à capacidade do parasito de realizar autoinfecção interna, pode persistir por décadas no hospedeiro humano sem a necessidade de uma nova exposição à infecção exógena (OLSEN *et al.*, 2009; MONTES *et al.*, 2010; SCHÄR *et al.*, 2013). Assim, mesmo indivíduos infectados com baixa carga parasitária e assintomáticos, situação de difícil diagnóstico, quando imunossuprimidos, podem evoluir para formas graves da doença, caracterizadas pela hiperinfecção e/ou disseminação do parasito, de difícil controle parasitológico e que apresentam alto grau de mortalidade associada (VADLAMUDI *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2015).

A identificação desses indivíduos infectados assintomáticos é essencial para o controle da transmissão e também para a prevenção de casos com manifestações graves e aumento da morbidade e mortalidade decorrentes da infecção (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013; BUONFRATE *et al.*, 2015a). Porém, o principal obstáculo para melhor compreensão da prevalência, da carga parasitária, caracterização clínica da infecção crônica e o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes está associado principalmente à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos disponíveis e/ou à ausência de alternativas mais sensíveis comercialmente disponíveis e validadas (BUONFRATE *et al.*, 2015a; KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019).

É importante salientar que quase a totalidade dos testes sorológicos para estrogiloidíase foi padronizada em camundongos, modelo experimental com um quadro de infecção agudo (SATO; TOMA, 1990; FINKELMAN *et al.*, 1997 e 2004) e que dificulta a caracterização da resposta humoral. Além disso, estudos em humanos têm sido realizados com amostras selecionadas para avaliação de testes sorológicos (ARIFIN *et al.*, 2019), que podem não refletir a complexidade encontrada em uma área endêmica, especialmente em indivíduos com baixa carga parasitária e presença de outras helmintoses. Além disto, apenas poucos estudos avaliaram a imunorreatividade de diferentes classes e/ou subclasses de anticorpos com potencial para detecção de infecção assintomática e/ou de baixa carga parasitária.

Devido a isso, a presente proposta se justifica pela necessidade de selecionar melhores técnicas parasitológicas e sorológicas em ratos como modelo experimental, uma vez que a infecção é mais prolongada, proporcionando uma melhor avaliação desses parâmetros em um perfil parasitológico e de carga parasitária bem definidos e, posteriormente, confirmar a eficiência das técnicas de maior sensibilidade em população humana em área endêmica.

## **4. OBJETIVOS**

---

## 4.1 Geral

Desenvolver, padronizar e avaliar alternativas para melhorar a sensibilidade dos testes de diagnóstico da estrogiloidíase, utilizando infecção experimental em ratos e amostras humanas coletadas em área endêmica com status parasitológico bem definido por múltiplos testes parasitológicos.

## 4.2 Específicos

### ➤ Em modelo experimental

- ❖ Avaliar a acurácia da técnica parasitológica de Rugai e de sua modificação para o diagnóstico da infecção experimental por *Strongyloides venezuelensis* em ratos;
- ❖ Caracterizar a sensibilidade da técnica de Rugai modificado e de duas técnicas parasitológicas, Cultura em Placa de ágar e Sedimentação espontânea, na detecção de ovos e/ou larvas do parasito em fezes de ratos infectados com diferentes cargas de *S. venezuelensis*, antes e após o tratamento com imunossupressor ou anti-helmíntico;
- ❖ Verificar perfil de leucócitos circulantes em diferentes períodos de infecção com diferentes cargas de *S. venezuelensis* em ratos;
- ❖ Caracterizar a reatividade plasmática de IgM, IgA, IgG total e dos isotipos IgG1 e IgG2a à diferentes extratos antigênicos de *S. venezuelensis* (extrato total de larva L3, extrato total de verme adulto e produtos excretados-secretados por larvas e vermes adultos) em diferentes períodos da infecção com diferentes cargas de *S. venezuelensis* em ratos;
- ❖ Avaliar o efeito do tratamento com imunossupressor ou com anti-helmíntico na resposta humoral e quadro leucocitário de ratos experimentalmente infectados com diferentes cargas de *S. venezuelensis*.

➤ **Em população humana**

- ❖ Realizar levantamento da prevalência da infecção por *S. stercoralis* em residentes da comunidade do Vergel do Lago, município de Maceió, Alagoas, a partir da utilização e aprimoramento de testes parasitológicos e imunológicos que apresentaram maior sensibilidade no modelo experimental;
  
- ❖ Comparar a sensibilidade, especificidade, concordância de métodos parasitológicos e testes sorológicos com antígenos heterólogos para identificação de indivíduos infectados com *S. stercoralis*.

## ***5. MATERIAL E MÉTODOS***

---



## 5.1 Modelo Experimental

### 5.1.1 Animais

Para realização deste estudo foram utilizados Ratos Wistar Hannover machos, recém-desmamados, com idades entre 4 a 6 semanas (~100 a 120g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante os procedimentos experimentais, todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG) Esses animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e alimentados com ração padrão de laboratório (marca Presence, Paulínia, SP, Brasil) e água em temperatura ambiente *ad libitum* e, após duas semanas do final do tratamento anti-helmíntico, foram utilizados para as infecções experimentais.

Todos os cuidados e procedimentos experimentais realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo de número 129/2020 (**Anexo A**).

### 5.1.2 Parasito

O nematódeo utilizado para os experimentos foi *S. venezuelensis*, parasito isolado inicialmente de *Rattus norvegicus* (BRENNER; CHAIA, 1960) e mantido no Departamento de Parasitologia (ICB-UFMG) através de sucessivas infecções em ratos da linhagem Wistar conforme protocolo CEUA 368/2018 (**Anexo B**). Resumidamente, a cepa de *S. venezuelensis* é rotineiramente mantida em três ratos machos com idade entre 4 a 6 semanas. Esses animais são infectados subcutaneamente a cada 15 dias com 2000 larvas infectantes do parasito e as fezes obtidas são utilizadas para realização de coproculturas e obtenção de larvas filarióides

### 5.1.3 Obtenção de larvas filarioides e infecções experimentais

Para obtenção das larvas filarioides infectantes (L3) de *S. venezuelensis* foram utilizadas coproculturas de fezes de ratos Wistar infectados entre 7 a 17 dias de infecção. As coproculturas foram feitas com a mistura de fezes contendo ovos do parasito e vermiculita expandida média (IZO-FLOK GR-2, Vermiculita Isolantes Termo Acústicos Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) na proporção 1:2, respectivamente, que em seguida foi umedecida com água, a fim de promover umidade adequada para o desenvolvimento das larvas e mantida em estufa a 28°C, por 48 a 72 horas. Através

da técnica de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) as larvas L<sub>3</sub> foram isoladas, filtradas (Kimwipes EX-L de 12x12 in./po, 30.4 x 30.4 cm - Kimberly-Clark) como descrito por Barçante e colaboradores (2003), concentradas e, posteriormente, lavadas (3-4 vezes) em solução fisiológica (0,85% NaCl), quantificadas e utilizadas para as infecções.

As infecções experimentais foram realizadas pela injeção subcutânea de 10 (carga baixa) ou 500 (carga alta) larvas infectantes em 100µl de solução fisiológica na região abdominal dos ratos. As cargas de infecção foram definidas conforme protocolo de Schilter e colaboradores (2010).

#### 5.1.4 Obtenção dos antígenos

Para obtenção de extratos antigênicos totais foram utilizadas larvas filarioides (L<sub>3</sub>) e vermes adultos (Sv) de *S. venezuelensis*. As larvas filarioides utilizadas foram isoladas, através da técnica de Baermann-Moraes, de coproculturas de fezes de ratos Wistar infectados, conforme detalhado anteriormente. Os parasitos adultos foram recuperados da mucosa intestinal de camundongos BALB/c após 7 dias de infecção com 2000 L<sub>3</sub>. Para tanto, os animais infectados foram eutanasiados e a metade proximal do intestino delgado desses animais foi separada, aberta longitudinalmente e incubada em solução salina por 4h a 37°C (SILVEIRA *et al.*, 2002; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2008). Após a retirada da mucosa intestinal, os vermes foram recuperados e lavados para uso na obtenção de antígenos.

Após isolamento, as larvas L<sub>3</sub> e os vermes adultos foram descontaminados de acordo com protocolo proposto por Barçante e colaboradores (2003). Resumidamente, os parasitos foram lavados em tampão PBS (PBS-13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,14 mM de KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,43 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O), incubados por 10 min em solução aquosa com 0.25% de hipoclorito de sódio (Solução de reserva contendo 10% de hipoclorito de sódio, Clorosul, Gravataí, RS, Brasil) e lavados novamente em PBS. Em seguida, foram incubados por 10 minutos em PBS acrescido de solução com coquetel de antibióticos (4mg/mL de Gentamicina, 1000un/mL de Penicilina e 1000µg/mL de Estreptomicina) e finalmente lavados mais uma última vez em PBS. As larvas L<sub>3</sub> e os vermes adultos descontaminados foram separadamente armazenados a -20°C até o momento da preparação do antígeno. Para a preparação dos antígenos totais, as larvas filarioides e os vermes adultos descontaminados foram ressuspendidos em PBS (1mL do pellet de L<sub>3</sub> ou verme adulto/3mL de PBS) contendo

coquetel inibidor de protease (um comprimido em 25 mL de PBS, Boehringer Mannheim, Indianápolis, USA), diluído conforme instruções do fabricante. As suspensões contendo os parasitos foram inicialmente mantidas em banho de gelo e então homogeneizadas com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power General 125, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) por 10 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto. Em seguida, pérolas de vidro (212-300 microns, SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis, USA) foram adicionadas nas suspensões e misturadas em vortex por 15 minutos. Posteriormente, as formas parasitárias (larvas ou vermes adultos) processadas foram transferidas para outro tubo, mantidas em banho de gelo e sonicadas em processador ultrassônico (PGC Scientific, Gaithersburg Md) utilizando-se 5 ciclos de 30 segundos em alta potência com intervalos de 1 minuto. Os homogenatos foram centrifugados a 3000g por 1 hora e as proteínas solúveis recuperadas com o sobrenadante (Protocolo adaptado de FERNANDES *et al.*, 2008).

Para a preparação do produto excretado-secretado (ES) de larvas L<sub>3</sub> ou vermes adultos de *S. venezuelensis*, os parasitos recuperados como descrito anteriormente foram lavados em tampão salina fosfatada (3-4 vezes) e axenizados através da incubação em PBS estéril contendo coquetel de antibióticos por 30 minutos (duas repetições) de acordo com protocolo adaptado de Barçantes *et al* (2003). Após axenização, os parasitos (larvas L<sub>3</sub> ou vermes adultos) foram cultivados por 24 horas em meio RPMI 1640 contendo 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em incubador umidificado (CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Harris®). Os produtos ES presentes no sobrenadante das culturas foram coletados e separados dos detritos por centrifugação (1400 rpm por 10 minutos). Em seguida, os sobrenadantes foram concentrados usando unidades de filtro de centrífuga com uma membrana de corte de 10 kDa (Centricon, Millipore, Bedford, MA) por centrifugação (3220g, 1h, 4°C). Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C até o uso posterior (Cançado *et al.*, 2011).

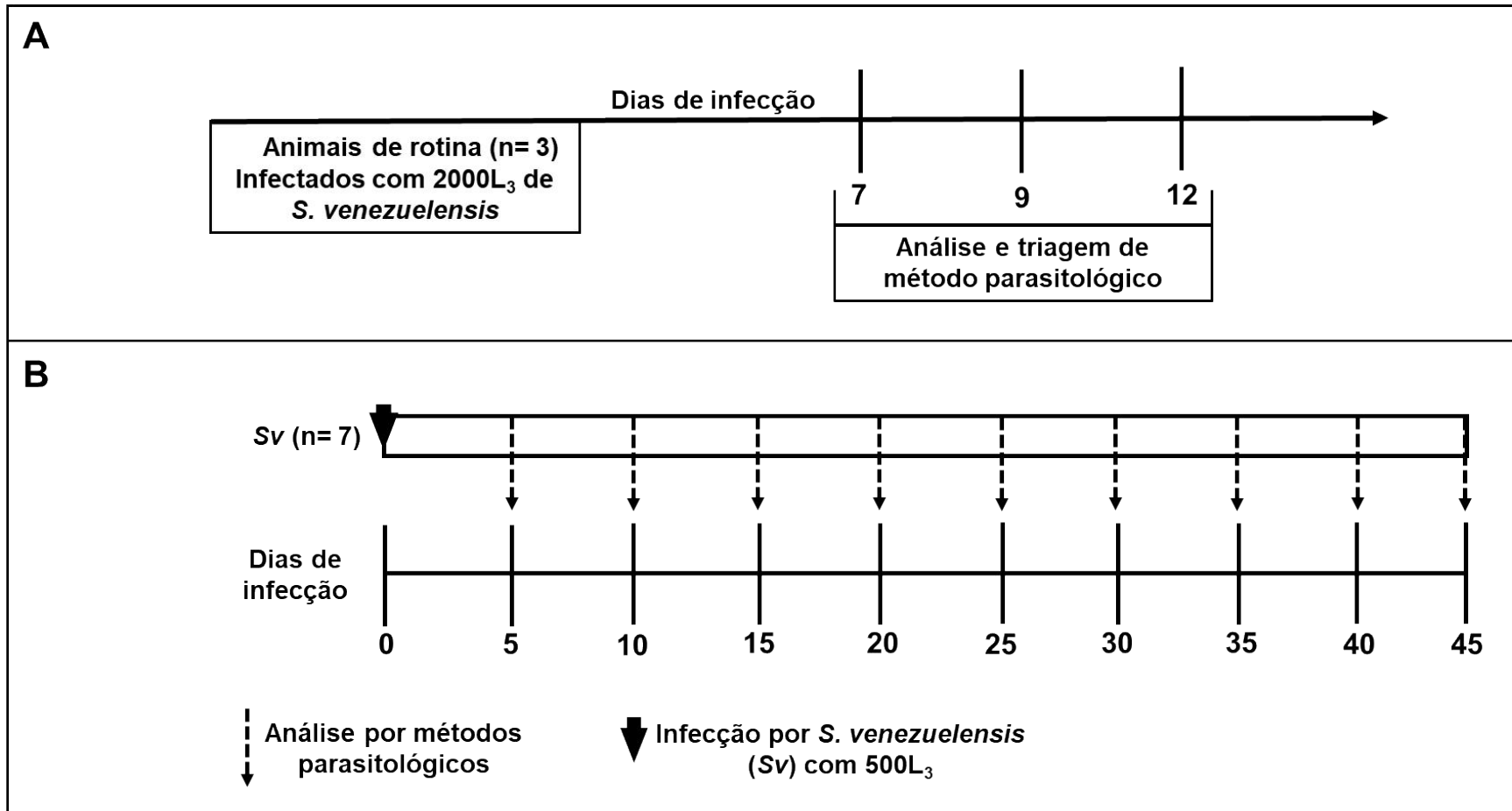
A concentração de proteínas das preparações antigênicas (L<sub>3</sub>, Sv, ES-L<sub>3</sub> ou ES-Sv) foram determinadas pelo ensaio de dosagem de proteína Pierce BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific - BR) antes de serem distribuídas em alíquotas e estocadas a -20°C.

### 5.1.5 Delineamentos experimentais

#### 5.1.5.1 Delineamento experimental I

Inicialmente, para avaliação e seleção do método parasitológico de concentração que foi utilizado em todo trabalho experimental, realizou-se experimento preliminar com fezes de três ratos *Wistar*, rotineiramente utilizados na manutenção da cepa de *S. venezuelensis* (conforme descrito no **item 5.1.2**). Aos 7, 9 e 12 dias de infecção foram realizadas coletas de fezes de cada animal que foram analisadas por três diferentes técnicas parasitológicas de concentração: técnica de Baermann-Moraes, técnica de Rugai e técnica de Harada-Mori (**Figura 7A**).

Em seguida, para avaliar o período de infecção e comparar a eficiência de alterações realizadas na técnica de Rugai (Rugai-modificado) em relação a técnica de Rugai original (método com melhor desempenho no experimento preliminar), 7 ratos *Wistar* foram experimentalmente infectados através da inoculação subcutânea de 100  $\mu$ L de PBS contendo 500 L<sub>3</sub> *S. venezuelensis* (Sv). Aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 dias de infecção foram feitas análises parasitológicas com as técnicas de Rugai-original e de Rugai-modificado (**Figura 7B**).



**Figura 7. Delineamento experimental I – A.** Avaliação e seleção de método parasitológico de concentração. **B.** Avaliação e comparação da eficiência de método parasitológico de concentração selecionado em relação a sua modificação.

### 5.1.5.2 Delineamento experimental II

Posteriormente, ratos foram experimentalmente infectados por *S. venezuelensis* e utilizados para caracterizar a eficácia do aprimoramento da técnica de Rugai em relação a outros métodos parasitológicos, bem como a avaliação de alterações leucocitárias e reatividade de anticorpos/isotipos à diferentes extratos antigênicos. Para tanto, os ratos foram aleatoriamente separados em quatro grupos experimentais: Grupo Ctrl composto por 15 animais que não foram infectados e não receberam tratamento; Grupo Sv composto por 28 animais que foram infectados individualmente com 500 L<sub>3</sub> *S. venezuelensis* (alta carga) pela via subcutânea; Grupo Sv + Dexametasona composto por 21 animais que foram infectados subcutaneamente com 500 L<sub>3</sub> *S. venezuelensis* e, aos 15, 16 e 17 dias de infecção receberam tratamento imunossupressor; e o Grupo Sv + Ivermectina composto por 21 animais que foram infectados com 500 L<sub>3</sub> *S. venezuelensis* e receberam tratamento anti-helmíntico nos dias 15 e 16 pós-infecção (**Figura 8**). O tratamento imunossupressor foi realizado com fosfato dissódico de dexametasona (Decadron Injetável, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., São Paulo, SP, Brasil) em dose de 4mg/Kg/dia pela via intraperitoneal (IP) (protocolo adaptado conforme descrito por Vilaça-Júnior *et al.*, 2012 e Liu *et al.*, 2014). O tratamento com anti-helmíntico foi feito com Ivermectina (Ivermec 1%- Chemitac®, Ipiranga, SP, Brasil) por via oral em dose de 200µg/kg/dia por dois dias consecutivos (Henriquez-Camacho *et al.* 2016).

Aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 dias pós-infecção fez-se a coleta de fezes de sete animais de cada grupo experimental, com exceção do grupo Ctrl, para a avaliação da detecção e contagem de ovos e/ou larvas nas fezes (**Figura 8**). Cada amostra de fezes coletada foi analisada através das técnicas parasitológicas de sedimentação espontânea (SS), Cultura em Placa de ágar (CPA), e técnica de Rugai-modificado (RMOD).

Para avaliação e contagem de leucócitos e obtenção do plasma para realização ensaios imunoenzimáticos, os mesmos animais da coleta de fezes foram utilizados nas coletas de sangue. Essas coletas foram feitas pelas veias laterais da cauda dos animais nos dias 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 pós-infecção. Cinco animais do grupo Ctrl também foram utilizados para coleta de sangue durante esse período (**Figura 8**).

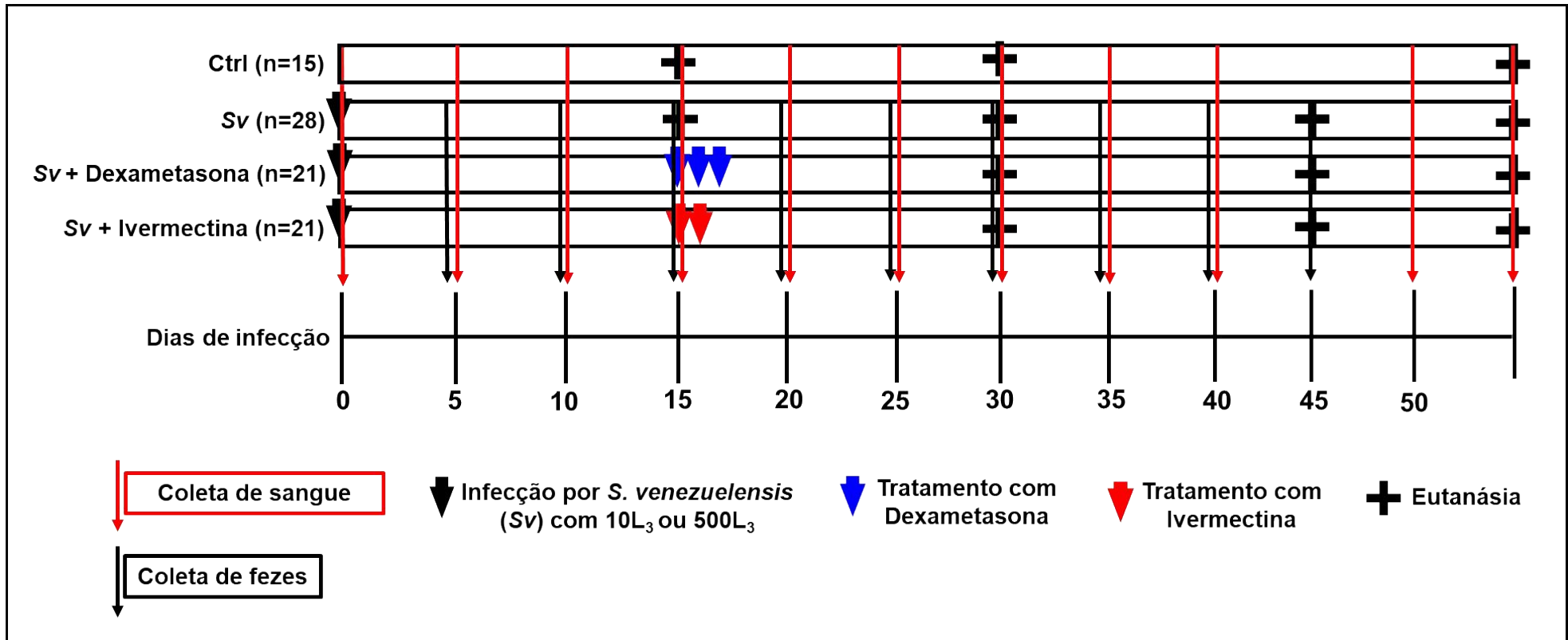
Para verificar a persistência da infecção a partir da recuperação de vermes,

os animais infectados e sem tratamento, aos dias 15, 30, 45 e 60 pós infecção, 7 ratos/ponto definido, foram eutanasiados (**Figura 8**); e os grupos infectados e tratados com imunossupressor ou com anti-helmíntico, a recuperação dos vermes adultos ocorreu nos dias 30, 45 e 60 pós-infecção, em 7 animais/ponto (**Figura 8**).

Para avaliar a detecção de IgA reativo a antígenos de *S. venezuelenses* no ensaio de ELISA como possibilidade do uso desse anticorpo em coprodiagnósticos, os mesmos animais eutanasiados para recuperação de vermes nos dias 15, 30 e 60 foram utilizados para realização do lavado intestinal. Para esse procedimento, animais do grupo Ctrl (5 ratos/ponto) também foram usados nos dias 15, 30 e 60 (**Figura 8**). Para eutanasia utilizou-se overdose anestésica por meio da inoculação intraperitoneal de PBS contendo cetamina (240 mg/kg, Cetamin®, Syntec, Santana do Parnaíba, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (45 mg/kg, Dopaser®, HertapeCalier, Embu-Guaçu, SP, Brasil), seguido por deslocamento cervical (MENDONÇA *et al.*, 2019). Nenhum animal apresentou pelagem eriçada, sangramento, agressividade, alteração na ingestão de água e ração ou perda de peso corporal expressiva durante o procedimento experimental.

Para os procedimentos acima, a metade anterior (duodeno e jejuno proximal) do intestino delgado desses animais foi cirurgicamente removida e realizou-se imediatamente o lavado intestinal desse órgão com a aplicação de 3mL de PBS contendo coquetel inibidor de protease. Posteriormente, o intestino delgado foi utilizado para recuperação e contagem de vermes.

Após o experimento com animais infectados com alta carga (500 L<sub>3</sub>), realizou-se outro experimento, agora com infecção de baixa carga utilizando 10 larvas filarioides de *S. venezuelenses*. Todos os procedimentos e análises feitos com esses animais infectados com baixa carga, seguiu o mesmo delineamento experimental já descrito (**Figura 8**).



**Figura 8. Delineamento experimental II** - Avaliação e caracterização da eficácia de técnicas parasitológicas e imunológicas em ratos durante a infecção com alta (500L<sub>3</sub>) e baixa (10L<sub>3</sub>) carga de *S. venezuelensis*, antes e após tratamento com dexametasona ou ivermectina.



### 5.1.6 Coleta e preparo do material fecal

Para identificação e contagem de ovos e/ou larvas do parasito nas fezes os ratos experimentalmente infectados, os animais foram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno (40x33x16cm) com papel de filtro umedecido por 1h, onde foram permitidos defecar (adaptado de CHAVES *et al.*, 2015) (**Figura 9A**). A amostra de fezes foi recolhida, homogeneizada (**Figura 9B**) e separada em subamostras de 1g de material fecal, cada amostra utilizada para avaliação através de diferentes técnicas parasitológicas descritas no **tópico 5.1.7**.



**Figura 9.** Procedimento de coleta e preparação da amostra de fezes.

**Fonte:** acervo do autor.

### 5.1.7 Técnicas Parasitológicas

#### 5.1.7.1 Método de Baermann-Moraes

Para o método de Baermann-Moraes (**Figura 10A**), a quantificação das larvas eliminadas nas fezes foi realizada de acordo com protocolo padrão (Baermann 1917; Moraes 1948). Vale ressaltar que diferentemente de *S. stercoralis*, que elimina diretamente as larvas nas fezes, a espécie *S. venezuelensis* utilizada no estudo experimental elimina os ovos nas fezes, que eclodem rapidamente em condições ambientais adequadas (TAKAMURE, 1995; TOLEDO *et al.*, 2015). Portanto, para

uma análise comparativa dos métodos de concentração de Rugai (original ou modificado), as amostras fecais de ratos infectados por *S. venezulensis* foram mantidas em contato com água aquecida por 24 horas para permitir o desenvolvimento e migração larval, e o sedimento foi avaliado posteriormente. Para tanto, amostras de fezes foram coletadas, pesadas (1g/animal), e alocadas sobre gaze dobrada. Em seguida, o material foi colocado em contato com água aquecida (45°C) contida no aparelho convencional de Baermann (funil conectado a uma mangueira de borracha). Após 24 horas em repouso coletou-se 5 a 7mL do líquido contido na mangueira, através de tubo de ensaio colocado na extremidade. O líquido recolhido do tubo de ensaio foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos, e o sedimento foi coletado, analisado em microscópio ótico (Nikon) e o resultado transformado em larvas/g/fezes.

#### 5.1.7.2 Método de Harada-Mori

Para a quantificação das larvas eliminadas nas fezes pela técnica de Harada-Mori (**Figura 10B**) foi utilizado o protocolo descrito por Harada-Mori (1955). De forma breve, a amostra de fezes foi coletada, homogeneizada e pesada (1g/animal), como descrito anteriormente. A amostra fecal homogeneizada foi espalhada em papel filtro com cerca de 150x15mm, preservando as extremidades da tira de papel. O papel de filtro contendo as fezes foi acomodado em tubo de ensaio de 50mL (Tubo Sarstedt™) contendo 7mL de água destilada, de maneira que a água atinja a extremidade do papel de filtro que não contem fezes para manter o material úmido. Em seguida, o tubo foi fechado e conservado em posição vertical durante 48h a 72h em temperatura ambiente (24° a 28°C). Após este período, todo o líquido contido no fundo do tubo foi recolhido, centrifugado e o sedimento analisado em microscópio ótico (Nikon) e o resultado apresentado em larvas/g/fezes.

#### 5.1.7.3 Cultura em placa de ágar (CPA)

A quantificação das larvas do parasito eliminadas nas fezes utilizando a técnica de Cultura em placa de ágar (**Figura 10C**) foi realizada seguindo protocolo previamente descrito (ARAKAKI *et al.*, 1988; KOGA *et al.*, 1991). Resumidamente, preparou-se o meio de ágar com 15g de ágar nutriente Difco™, BD (Sparks, MD21152 USA) em 1L de água destilada. Em seguida, 10mL do meio de ágar obtido foi adicionado em placas de Petri descartáveis estéreis (140x15mm) que, após

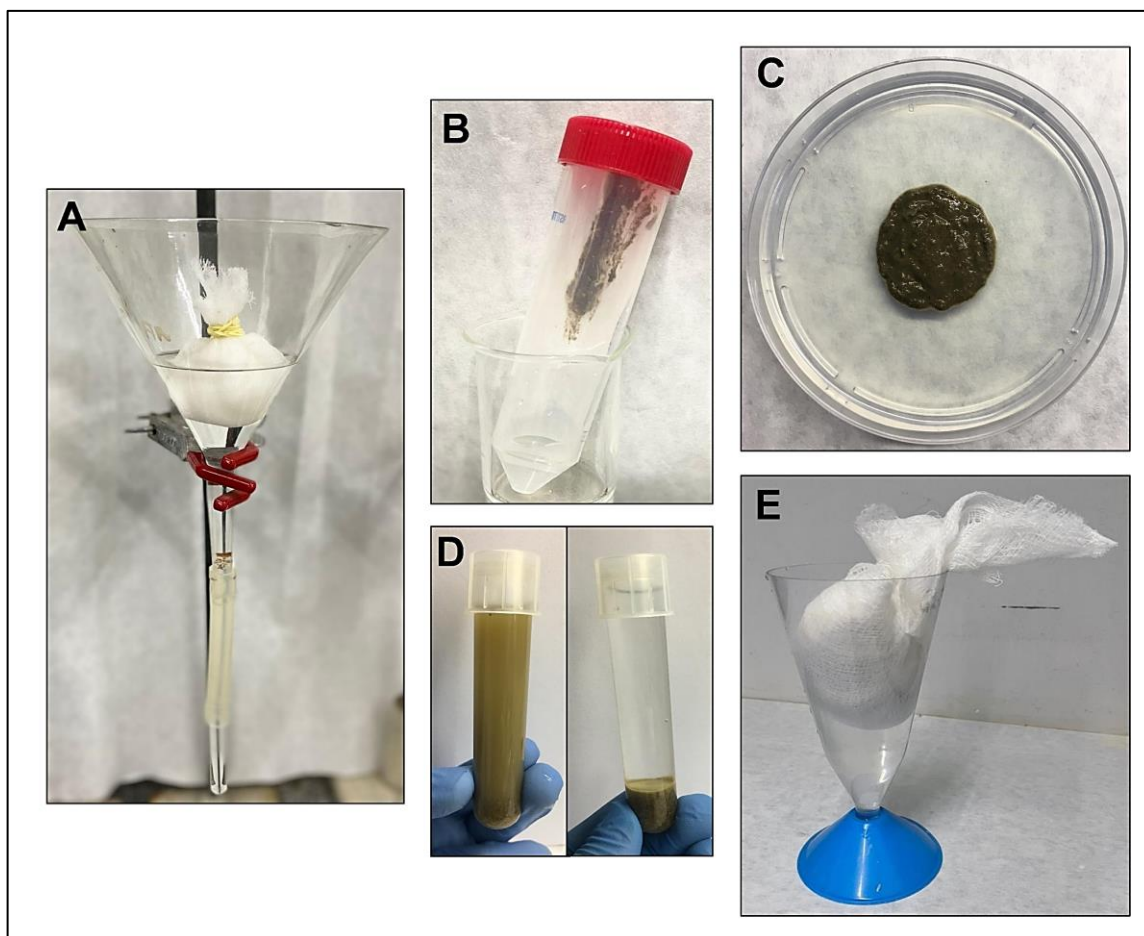
solidificação, foram embaladas e guardadas em geladeira a 4°C. Durante o ensaio parasitológico, espalhou-se 1g de fezes homogeneizadas na parte central das placas de ágar que, posteriormente, foram lacradas com parafilme e incubadas a 37°C por 24h. Após o tempo de incubação, retirou-se o material fecal, e as placas foram lavadas com 15mL de álcool etílico 70%, onde o lavado foi recolhido da superfície do ágar e centrifugado a 3000 rpm por três minutos. O sedimento foi concentrado em 5mL do líquido recolhido, corado com solução de Lugol, e alíquotas de 100µL de cada amostra foram analisadas em duplicata em microscópio ótico (Nikon) e o resultado transformado em larvas/g/fezes.

#### 5.1.7.4 *Sedimentação espontânea (SS)*

A presença de ovos e/ou larvas do parasito eliminados nas fezes também foi quantificada através da técnica de sedimentação espontânea (**Figura 10D**), modificada por Negrão-Corrêa e colaboradores (2006) para permitir uma avaliação quantitativa. De forma resumida, as amostras de fezes foram coletadas, homogeneizadas, pesadas (1g/animal) e posteriormente diluídas, com auxílio de um bastão de vidro, em 5mL de PBS contendo 10% de formalina para fixação do material. Alíquotas de 100µL de cada amostra foram analisadas em duplicatas em microscópio ótico (Nikon eclipse E200, New York, USA) e o resultado foi transformado em ovos ou larvas/g/fezes.

#### 5.1.7.5 *Técnica de Rugai original (RO)*

Para essa técnica, a quantificação de larvas eliminadas nas fezes foi feita conforme descrito por Rugai e colaboradores (1954) (**Figura 10E**). De maneira sucinta, amostras de 1g de fezes foram homogeneizadas e colocadas em gaze dobrada. A gaze contendo as fezes foi transferida para a superfície de um cálice de sedimentação contendo água aquecida a 45°C, de modo que o líquido estivesse em contato com a gaze contendo fezes. Após 24 horas, o sedimento no fundo do cálice foi recolhido, corado com Lugol e alíquotas de 100µL de cada amostra foram examinadas em duplicata em microscópio ótico (Nikon), e o resultado transformado em larvas/g/fezes.

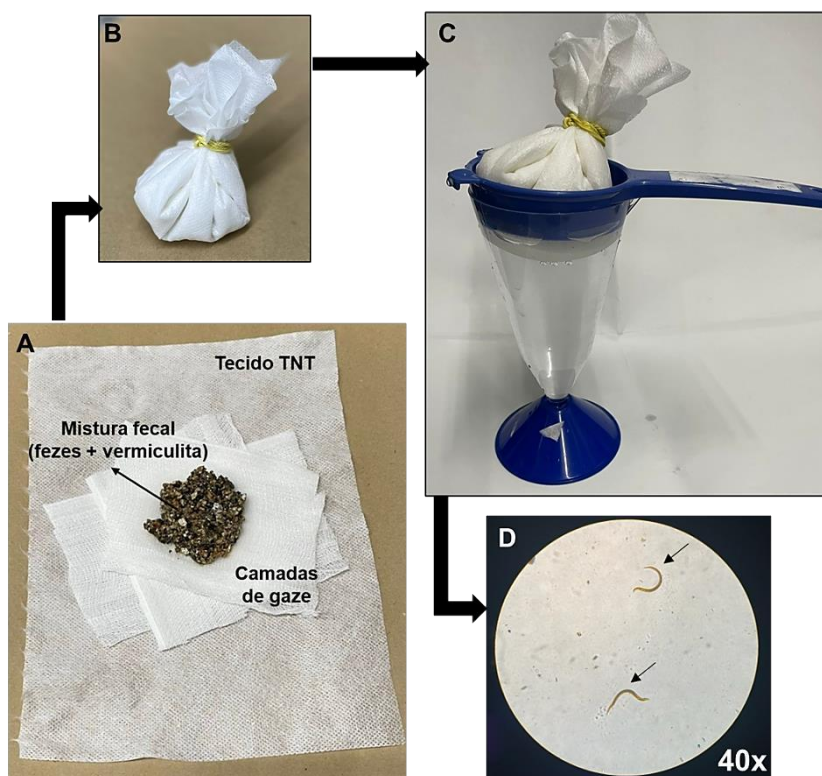


**Figura 10.** Técnicas parasitológicas utilizadas na quantificação de ovos e/ou larvas de *S. venezuelensis* nas fezes dos ratos experimentais. **A.** Baermann-Moraes. **B.** Harada-Mori. **C.** Cultura em placa de Ágar. **D.** Sedimentação espontânea. **E.** Rugai-original. **Fonte:** acervo do autor.

#### 5.1.7.6 Técnica de Rugai-Modificado (RMOD)

Neste trabalho, foram incorporadas algumas modificações na técnica de Rugai com intuito de facilitar a análise e aumentar a sensibilidade do teste, e este novo procedimento foi designado de técnica de Rugai modificado (**Figura 11**). Entre as modificações introduzidas está a pesagem das fezes utilizadas, a homogeneização da amostra fecal com vermiculita (ou carvão ativado particulado) e o uso de tecido TNT como filtro adicional para obtenção de um sedimento limpo e fácil de analisar. Inicialmente, a técnica foi padronizada para avaliar as amostras de fezes de ratos experimentalmente infectados, onde 1g de fezes foi homogeneizada em água filtrada, até que o material fecal apresentasse consistência pastosa. Em seguida, se acrescentou e misturou vermiculita expandida média na proporção de 1:2 (fezes/vermiculita). A mistura de fezes e vermiculita foi depositada sobre três camadas

de 15x15cm de gaze cirúrgica (Gaze Tipo Queijo 11F) e envolta por uma camada de 20x20cm de TNT (TNT 40G Liso) (**Figura 11A**) e juntou-se as pontas da camada de TNT e gaze formando uma trouxa que, com auxílio de barbante ou liga elástica, conteve o material fecal (**Figura 11B**), assegurando que ela não se desfizesse. Em um cálice de sedimentação, foi adicionado água filtrada aquecida (40-42°C) até próximo ao topo e, sobre esse cálice, colocou-se uma peneira de plástico com cabo de 7cm e o material fecal envolto por gaze e TNT dentro da peneira, de modo que ficasse em contato com a água aquecida (**Figura 11C**). Após 24 horas (período estabelecido para eclosão da larva de *S. venezuelensis*), com auxílio de pipeta Pasteur foi recolhido 9mL do fundo do cálice de sedimentação e imediatamente adicionou-se 1mL de formalina (Formaldeído 37% PA-ACS, Labsynth®, Diadema, SP, Brasil). Esse material foi homogeneizado, centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, e, em seguida, cuidadosamente desprezou-se 9mL do sobrenadante restando 1mL do material sedimentado, que foi corado com solução de Lugol, e alíquotas de 100µL de cada amostra foram analisadas em duplicata em microscópio ótico (Nikon) e o resultado transformado em larvas/g/fezes. Para a realização da técnica utilizando amostras fecais humanas, utilizamos 10g de fezes, que foram homogeneizadas e misturadas à vermiculita, como descrito anteriormente. O período de sedimentação sobre água filtrada aquecida (40-42°C) para essas amostras foi 2 horas, uma vez que *S. stercoralis* elimina larvas e não ovos nas fezes dos indivíduos infectados.



**Figura 11.** Técnica parasitológica de Rugai-modificado. **A, B e C** - Principais etapas de montagem da técnica. **D** – Material processado, limpo e fácil de analisar em aumento de 40x do microscópio (setas = larvas de *Strongyloides*).

#### 5.1.8 Recuperação de vermes de *S. venezuelensis* no intestino de ratos infectados

Para certificação da cura parasitológica dos ratos experimentalmente infectados, vermes adultos de *S. venezuelensis* foram recuperados da metade proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal) dos animais infectados e contabilizados. Para tanto, os animais foram anestesiados com sobredose anestésica e eutanasiados para retirada da metade anterior do intestino delgado, que foi seccionada longitudinalmente, colocada sobre uma tela dentro de cálice de sedimentação contendo solução salina (0,85% NaCl) e incubada em banho-maria por 4h a 37°C. Após este período, os vermes adultos depositados no fundo dos cálices foram colocados em placas de Petri contendo solução fisiológica e quantificados em microscópio estereoscópico. O tecido intestinal também foi recuperado para quantificação dos vermes aderidos à mucosa que foram somados ao total (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2004).

#### 5.1.9 Obtenção de sangue e plasma

Amostras de sangue utilizadas para avaliação leucométrica e obtenção do plasma foram coletadas de veias laterais das caudas dos ratos, conforme descrito por Zou e colaboradores (2017). Resumidamente, os animais foram previamente imobilizados em suporte de contenção de plástico (adaptado segundo Pereira, 2001), onde suas caudas foram expostas e lavadas com água destilada aquecida a 30°C e limpas com etanol a 70%. Com auxílio de seringa descartável de 1mL (Seringa SSIAA070B, Descarpack, São Paulo, SP, Brasil) com agulha estéril de 22G (Agulha 0.70x25, 22g X1, Medix Brasil, Cascavel, PR, Brasil) foi coletado cerca de 0,2 a 0,4mL de sangue de uma das veias laterais da cauda e colocado em microtubo de 0,5mL para coleta de sangue contendo EDTA (Microtubo FL5-1105, FirstLab, São José do Pinhais, PR, Brasil). Esse microtubo foi invertido suavemente várias vezes para misturar o anticoagulante no sangue e alocado em banho de gelo verticalmente. Uma pequena parte do sangue coletado foi usada para contagem total e diferencial de leucócitos e a outra parte centrifugada (3000g, 4 °C por 10 minutos) e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para avaliar a reatividade de IgM, IgA, IgG total e dos isotipos IgG1 e IgG2a frente a extratos antigênicos das diferentes fases do parasito.

#### **5.1.10 Avaliação leucométrica**

Após obtenção do sangue, conforme descrito anteriormente, de cada amostra foram retirados 10uL para confecção do esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro para a contagem diferencial de leucócitos. Os esfregaços sanguíneos foram corados com Panótipo (Renylab®, Barbacena, MG, Brasil) e os leucócitos (100 células) classificados em linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, de acordo com suas características, como relação citoplasma/núcleo e presença/ausência de grânulos citoplasmáticos.

Uma segunda amostra de 20uL de sangue total foi diluída em 400µL do Líquido de Turck (100mL de solução de ácido acético 2%, 1mL de solução de violeta genciana) para contagem total de leucócitos. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara Neubauer e todas as células presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara foram contabilizados com auxílio de microscópio óptico (Nikon) sob aumento de 400X. Ao total de células contadas (N) foi aplicado a fórmula: Leucócitos/mm<sup>3</sup> = N x 50 (RODRIGUES *et al.*, 2021).

### 5.1.11 Detecção de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A presença dos anticorpos reativos à extratos antigênicos do parasito, incluindo extrato total de larvas filarioides (L<sub>3</sub>), de fêmeas parasitas (Sv), fração solúvel excreto secretada de larvas filarioides (ES/L<sub>3</sub>) e fração solúvel excreto secretada de fêmeas adultas (ES/Sv) foi estimada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) nas amostras de plasma coletadas dos animais experimentais dos diferentes grupos experimentais durante o tratamento. Para a realização dos ensaios, as diluições dos diferentes reagentes e do plasma foram previamente padronizadas. Nos ensaios de anticorpos conjugados com biotina foram utilizados tampões de diluição e bloqueio contendo albumina de soro bovino (BSA, Sigma) e os de anticorpos conjugados com peroxidase, o bloqueio e diluições foram realizados em tampões contendo leite desnatado (Molico®, Nestlé).

A concentração de IgM, IgA IgG total e seus subtipos IgG1 ou IgG2a no plasma foram determinadas utilizando anticorpos comercialmente disponíveis (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, Texas). Resumidamente, placas de 96 poços (Costar® 96 Well EIA/RIA Assay Microplate, Corning Incorporated, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100µL/poço de tampão Carbonato-Bicarbonato (0,5 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 0,5 M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) contendo 5µg/ml de antígeno de L<sub>3</sub> ou verme adulto (Sv); ou 10µg/ml de antígeno Excretado-Secretado (ES) de L<sub>3</sub> ou ES/verme adulto. As placas foram incubadas por 12h a 4°C e protegidas com plástico filme para evitar a dessecação. Após este período e entre cada etapa de incubação com reagentes, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem contendo PBS (Phosphate buffer saline: 13,7mM de NaCl, 0,27mM de KCl, 0,14mM de KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,43mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, pH 8) acrescido de 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Em seguida, as placas foram bloqueadas por 1h com tampão de lavagem contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) ou 2% de Molico, e lavadas quatro vezes com tampão de lavagem. Posteriormente, 100uL/poço das amostras de plasma diluídas (1:200) em tampão de diluição (PBS contendo 0,05% Tween 20 e 0.1% de BSA ou 0.2% de Molico, pH 7,4) foi adicionado às placas e a solução permaneceu por 2h a temperatura ambiente. Na sequência, foi adicionado 100µl/poço do tampão de diluição contendo anticorpo anti-imunoglobulina de rato diretamente conjugado à peroxidase ou conjugado com biotina, conforme demonstrado na **Tabela 1**. A solução contendo os anticorpos anti-Ig de ratos permaneceu incubado por 2h em temperatura ambiente. Após nova lavagem, às placas com solução contendo



anticorpos anti-Ig de ratos conjugados com biotina foram adicionados 100µl/poço de tampão de bloqueio (PBS contendo 0,05% Tween 20 e 1% de BSA) contendo estreptavidina conjugada com peroxidase (Streptavidin-HRP B, 2mL BioTechne, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) na diluição de 1:400 e as placas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para ensaios utilizando anticorpos diretamente conjugados com peroxidase, essa etapa não foi necessária. Posteriormente, a reação foi revelada pela adição de 100µl/poço de tampão Citrato ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  a 0.1M,  $Na_2HPO_4$  a 0.2M, pH 5) contendo substrato OPD (OPD Substrate Tablets, Thermo Scientific, USA) acrescido de peróxido de oxigênio a 0,05 M, e após 30 minutos, a reação foi interrompida utilizando 50µL/poço de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  2N). A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, Califórnia, EUA) a 492 nm. Em cada placa foram adicionadas amostras de plasma de animais controles negativos e positivos.

**Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas no ensaio de ELISA**

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Observações</b>
IgM	1:10.000	Goat Polyclonal Anti-Rat IgM – Conjugate Biotin
IgG	1:5.000	Goat Polyclonal Anti-Rat IgG-Fc Fragment – Conjugate Biotin
IgG1	1:3.000	Goat Polyclonal Anti-Rat IgG1 – Conjugate HRP
IgG2a	1:3.000	Goat Polyclonal Anti-Rat IgG2a – Conjugate HRP
IgA	1:5.0000	Goat Polyclonal Anti-Rat IgA – Conjugate Biotin

Os dados obtidos na forma de absorbância foram apresentados como reatividade relativa de cada imunoglobulina testada com cada antígeno. A reatividade relativa (RR) foi calculada da seguinte maneira: absorbância de cada amostra dividida pela média das absorbâncias do grupo não infectado mais duas vezes o desvio padrão deste grupo.

$$RR = \frac{\text{Absorbância de cada amostra}}{\text{Média das absorbâncias do grupo não infectado} + 2X \text{ desvio padrão das amostras do grupo não infectado}}$$

Assume-se que:

RR ≤ 1 a amostra não é reativa.

RR > 1 a amostra apresentada é reativa.

#### 5.1.12 Obtenção do lavado intestinal e dosagem de IgA

O lavado intestinal foi obtido com a aplicação de 3mL de PBS estéril contendo coquetel inibidor de protease (1 tablete em 25mL de PBS; Boehringer Mannheim, Indianápolis, USA) na metade proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal) dos animais experimentais. O material recolhido foi centrifugado (3000g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior realização do ensaio de ELISA para avaliar a presença de IgA.

A dosagem dos níveis de IgA reativos aos extratos antigênicos de *S. venezuelensis* (L<sub>3</sub>, Sv, ES/L<sub>3</sub> ou ES/Sv) no lavado intestinal dos animais experimentais também foram previamente padronizados e determinados usando anticorpo comercialmente disponível (Bethyl Laboratories). O ensaio imunoenzimático aplicado para as amostras do lavado intestinal seguiu a mesma sequência metodológica já descrita anteriormente (**tópico 5.1.11**), porém com algumas diferenças em relação as diluições dos antígenos, amostras e anticorpo testado. As concentrações antigênicas utilizadas para sensibilização foram de 10µg/ml do antígeno de L<sub>3</sub> ou verme adulto; ou 20µg/ml do antígeno de Excretado-Secretado (ES) de L<sub>3</sub> ou ES/verme adulto. As amostras de lavado intestinal foram diluídas na concentração de 1:4 em tampão de diluição (PBS contendo 0,05% Tween 20 e 0.1% de BSA, pH 7,4) e o anticorpo anti-IgA de rato (Goat Polyclonal Anti-Rat IgA – Conjugate Biotin) foi diluído na concentração de 1:10.000 em tampão de diluição. Nesses ensaios, foram adicionadas amostras de lavado intestinal de animais controles negativos e positivos, e as absorbâncias obtidas também foram apresentadas em forma de reatividade relativa.

### 5.1.13 Análise estatística dos dados obtidos em modelo experimental

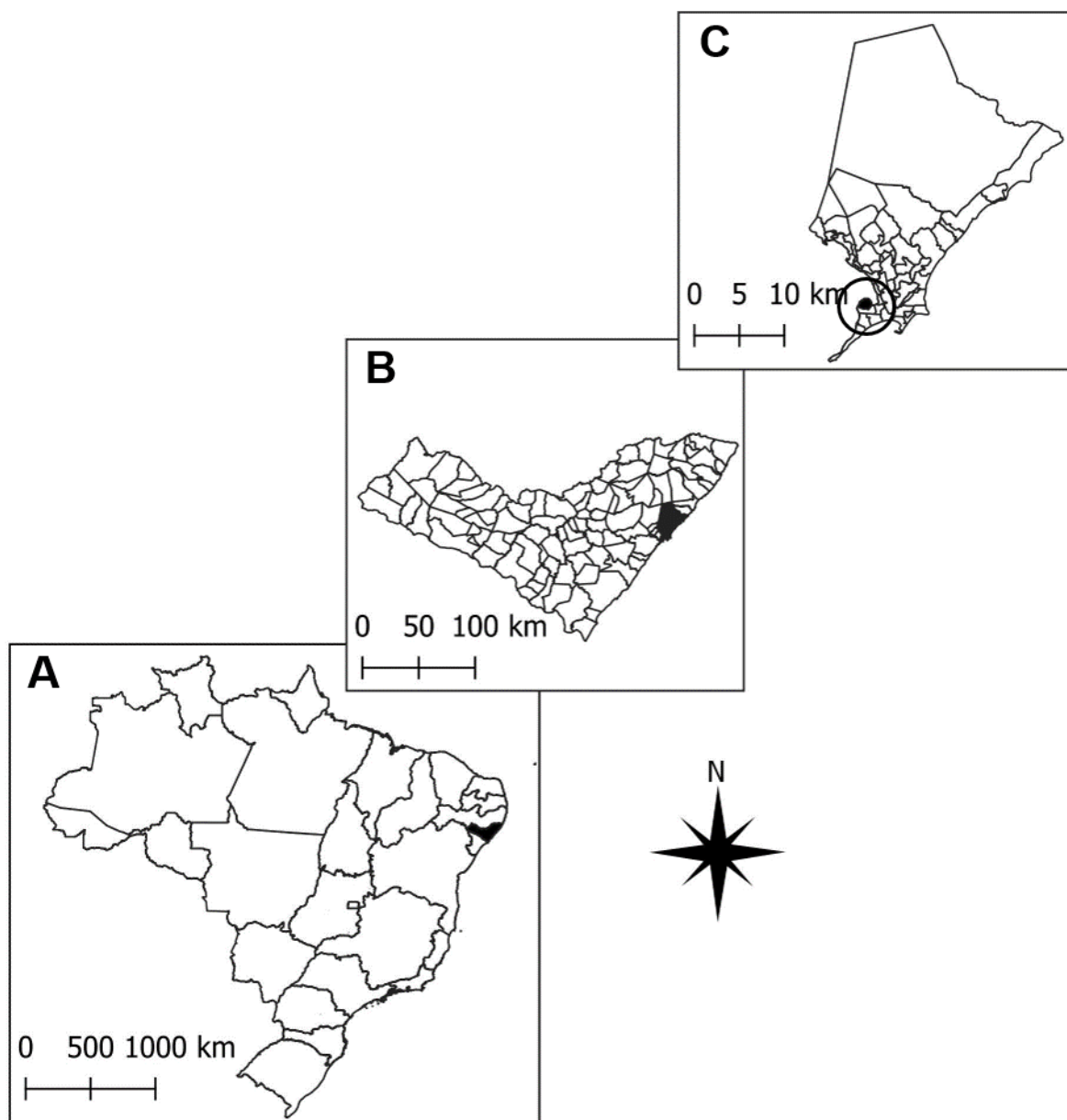
Todos os dados foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido pelo teste de Bonferroni para a comparação das médias dos dados paramétricos entre mais de dois grupos e o teste T de Student quando comparado apenas dois grupos. A comparação das medianas obtidas de dois grupos experimentais com distribuição não paramétrica foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. As frequências foram expressas em porcentagem e comparadas pelo teste exato de Fisher. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Para a realização das análises estatísticas e construção dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, California, USA).

## 5.2 População humana

### 5.2.1 Caracterização da área de estudo

A segunda parte da pesquisa, os testes de melhor desempenho diagnóstico no modelo experimental foram utilizados para avaliar população humana que vive em áreas de transmissão de geohelmintos. Especificamente neste trabalho utilizaremos amostras biológicas (soro e fezes) coletadas de residentes de uma área situada em Vergel do Lago (9°39'4" S 35°46'0" O) em Maceió, AL (**Figura 12C**).

Vergel do Lago é um bairro inserido na planície lagunar do município de Maceió, localizado no estado de Alagoas, e tem uma área de 1,4Km<sup>2</sup> (**Figura 12**). Apresenta clima tropical semiúmido com estações bem definidas, período úmido-chuvoso entre abril e agosto, e seco-estiagem entre setembro e março (MILANI; OLIVEIRA, 2021). É considerado o sétimo bairro mais populoso de Maceió, com uma população estimada em 31 mil habitantes no ano de 2010 (IBGE, 2010). O bairro possui ocupações irregulares, a exemplo de favelas, às margens da lagoa Mundaú e canais da região; a população residente tem como principal atividade econômica a comercialização do sururu pescado na lagoa Mundaú, e vive em precárias condições socioeconômicas, de saneamento, com esgoto a céu aberto e a presença de lixo, propiciando inúmeras formas de transmissão de doenças relacionadas ao saneamento ambiental inadequado, como a estrogiloidíase (TAMANO *et al.*, 2015).



**Figura 12. Localização da área de estudo. A – Estado de Alagoas. B – Cidade de Maceió. C – Vergel do Lago. Fonte: MORORÓ (2023).**

### 5.2.2 População de estudo e considerações éticas

O trabalho desenvolvido na população do município de Maceió, foi realizado uma amostragem de conveniência de indivíduos cadastrados no Centro Comunidade Espírita Nosso Lar, através do projeto de Gestão compartilhada em Saúde (FAPEAL/PPSUS/DecitSCTIE-MS/CNPq/SESAU-AL) coordenado pelo Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Wagner Porto, da Universidade Federal de Alagoas. Esse projeto realiza levantamento da prevalência de esquistossomose e outras helmintíases associadas, em moradores do bairro Vergel do Lago vinculados ao Centro da Comunidade Espírita

Nosso Lar, uma associação que desenvolve trabalhos comunitários ajudando famílias carentes que residem no bairro.

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da COEP (CAAE: 55239522.3.0000.5149 e parecer: 4.498.509 – **Anexo C**. Todos os participantes do estudo ou seus representantes legais foram informados sobre os objetivos do projeto e possíveis riscos envolvidos na pesquisa. Após todos os esclarecimentos, foi solicitado aos indivíduos que concordaram em participar do estudo que assinassem o Termo de Consentimento Livre Esclarecido e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (**Anexo D**). Todos os procedimentos de conduta ética foram realizados antes do agendamento das coletas de amostras biológicas (fezes e sangue). Os resultados dos procedimentos realizados com a população foram individualmente encaminhados para cada paciente. Os pacientes com exames positivos receberam ou receberão tratamento oral gratuitamente no posto de saúde local, utilizando Albendazol (400mg em dose única) para helmintos intestinais, Praziquantel (40-60mg/kg) para esquistossomose, e metronidazol (250mg/2x /5 dias) para controle de protozoários parasitos.

**Crítérios de Inclusão:** residentes da região, com idade entre 6 e 70 anos, de ambos os sexos, que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (**Anexo D**). Os participantes foram instruídos a não utilizar nenhum medicamento antiparasitário durante o período de coleta de material biológico.

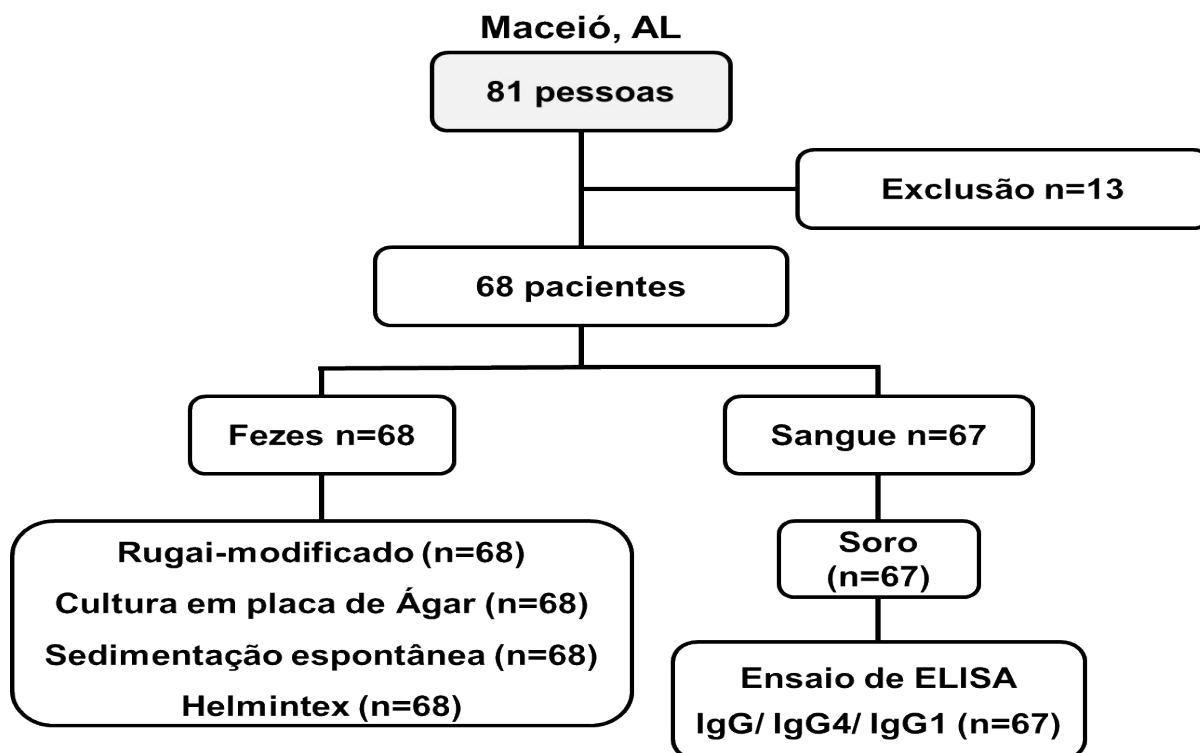
**Crítérios de Exclusão:** indivíduos que não consentiram em participar da pesquisa ou não assinaram o TCLE; mulheres grávidas; indivíduos portadores de doenças cognitivas, psiquiátricas e distúrbios de comportamento, que pudessem de alguma forma interferir na habilidade do voluntário de entender e cooperar com o protocolo de estudo.

### 5.2.3 Delineamento experimental da população em estudo

A partir do quantitativo de pacientes que aceitaram participar da pesquisa e que atenderam aos critérios de inclusão, demos continuidade às próximas etapas que se encontram delineadas na **Figura 13**. Nas coletas, que foram realizadas em abril de 2022, 81 indivíduos cadastrados e residentes aceitaram participar do estudo, entretanto apenas 68 indivíduos entregaram amostras de fezes para realização dos testes parasitológicos e puderam ser incluídos no presente estudo. Cada participante

forneceu uma amostra de fezes, que foi recolhida em recipiente de plástico de 500mL, suficiente para uma evacuação completa. Desse material, 10g de fezes foi utilizado para a realização do método de Rugai-modificado (técnica parasitológica que desempenhou melhor sensibilidade na detecção de larvas no modelo experimental); 3g para técnica de Cultura em placa de Ágar (ARAKAKI *et al.*, 1988; KOGA *et al.*, 1991); 30g para técnica de Helmintex® (TEIXEIRA *et al.*, 2007); e ~5g foi processado para realização da Sedimentação espontânea (HOFFMAN *et al.*, 1934) (**Figura 13**).

Juntamente com a amostra de fezes, os participantes foram convidados a fornecer amostras de sangue venoso. As coletas foram realizadas no período da manhã com os pacientes em jejum. Dos 68 indivíduos que forneceram fezes, somente em um indivíduo se recusou a coletar sangue. Em adultos (até 70 anos), o volume de sangue recolhido foi de 15mL para tubo sem anticoagulantes. Em crianças ou adolescentes (6-17 anos), reduziu-se para 10mL a quantidade de sangue para a estocagem em tubos sem anticoagulantes. Os tubos contendo amostras de sangue, após coagulação, foram centrifugados durante 15 minutos a 2.000rpm para a obtenção do soro. O soro obtido foi separado em alíquotas de 500µl em tubos eppendorf, que foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos testes sorológicos. Todo protocolo de processamento das amostras foi realizado segundo Oliveira e colaboradores (2018) (**Figura 13**).



**Figura 13. Delineamento do estudo em residentes de Vergel do Lago, Maceió, AL.** Demonstração da coleta de amostras biológicas e sua utilização no estudo para levantamento dos casos de *S. stercoralis* e outros helmintos e protozoários intestinais.

#### 5.2.4 Avaliação parasitológica

A avaliação parasitológica na população estudada foi realizada a partir dos métodos apresentados abaixo.

- Os métodos de Cultura em placa de ágar (CPA) (3g de fezes) e Rugai-modificado (RMOD) (10g de fezes) foram realizados conforme já descritos anteriormente (tópico **5.1.7 Técnicas Parasitológicas**).

- A técnica de Sedimentação Espontânea (SS) para as amostras humanas foi realizada de acordo com protocolo padrão comumente aplicado (HOFFMAN *et al.*, 1934). De forma resumida, as amostras de fezes (~5g) foram homogeneizadas em um béquer com 10mL de água filtrada contendo formalina a 10%, e em seguida foi transferida para um cálice passando por um filtro composto por gaze dobrada sobre uma peneira. Adicionou-se mais água filtrada sobre a amostra até completar o volume do cálice. Após 2h de decantação, amostras do sedimento foram analisados em microscópio ótico.

- O Helmintex®, técnica utilizada para detecção de infecção em indivíduos infectados com baixa carga parasitária de *Schistosoma mansoni*, foi realizada nesse



estudo conforme os protocolos descritos por Teixeira e colaboradores (2007) e Favero e colaboradores (2017). Essa técnica foi utilizada devido a área ser endêmica para esquistossomose, e para termos um status parasitológico bem definido de indivíduos infectados somente para *S. stercoralis*. Resumidamente, 30g de fezes foram suspensas em etanol 70% e tratadas com detergente (Tween-20), e submetidas a várias etapas de filtração e sedimentação para limpeza da amostra. Em seguida, o sedimento contendo os ovos do parasito foi adicionado uma solução com partículas magnéticas de óxido de ferro (Bangs Labs, EUA), e está foi exposta a um campo magnético. Os ovos de *S. mansoni* aderem às partículas magnéticas e são separados do restante do material fecal pelo campo magnético. Por fim, a suspensão livre foi descartada e as partículas aderidas, que formaram o sedimento final, foram misturadas com solução de ninidrina a 3% e transferidas para lâminas de microscópio para busca dos ovos de *S. mansoni*.

#### 5.2.5 Ensaio imunoenzimático padronizado

A detecção de imunoglobulinas reativas a antígenos de *Strongyloides* nos soros obtidos de indivíduos da população de estudo foram determinadas através de ensaios imunoenzimáticos, baseado nos extratos antigênicos e isotipos de imunoglobulinas que apresentaram melhor desempenho para diagnóstico do parasito na infecção experimental em ratos. Após a definição dos melhores antígenos e isotipos a serem utilizados, o procedimento foi padronizado para realização em humanos, otimizando a diluição do soro, o sistema de bloqueio e a diluição dos reagentes. Para realização do teste, placas de 96 poços (Nunc-Maxisorb Nagle Nunc International, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100µL/poço de tampão Carbonato-Bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,5M, pH 9,6) contendo 5µg/ml de antígeno solúvel de L<sub>3</sub> ou verme adulto (Sv). As placas foram incubadas por 12h a 4°C, e protegidas com plástico filme para evitar a dessecação. Após este período e entre cada etapa de incubação com reagentes, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem contendo PBS (Phosphate buffer saline: 13,7mM de NaCl, 0,27mM de KCl, 0,14mM de  $\text{KH}_2\text{SO}_4$  e 0,43mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 8) acrescido de 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Posteriormente as placas foram bloqueadas com tampão de lavagem contendo 2% de leite desnatado (Molico®, Nestlé) a temperatura ambiente por 1h, e lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, 100uL/poço de amostra de soro de cada paciente diluído (1:100) em

tampão de diluição (PBS + 0,05% Tween 20 + 0.1% de Molico + pH 7,4) foi adicionado às placas, e a solução permaneceu por 2h a temperatura ambiente. Na sequência foi adicionado 100µl/poço do tampão de diluição contendo anticorpo anti-imunoglobulina humana. Na população humana foi utilizado anticorpo anti-IgG4 humano, isotipo funcionalmente equivalente ao IgG2a de ratos, conjugado com biotina na diluição de 1:10.000 (Mouse Monoclonal Anti-Human IgG4-Biotin conjugated, SIGMA); anticorpo anti-IgG1 conjugado com biotina na diluição de 1:3.000 (Mouse Monoclonal Anti-Human IgG1-Biotin conjugated, SIGMA); anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase na diluição de 1:10.000 (Goat anti-Human IgG (H+L) HRP- Bethyl Laboratories). A solução contendo anticorpos anti-Ig humano permaneceu incubada na placa por 1h em temperatura ambiente.

Em seguida, para reações onde foi utilizado o anticorpo anti-Ig humana conjugado com biotina, como anti-IgG4 e anti-IgG1, foi adicionado 100µl/poço de tampão de diluição (PBS + 0,05% Tween 20 + 0.1% de Molico) contendo estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Streptavidin-Alkaline Phosphatase from Streptomyces avidinii- SIGMA®, USA) na diluição de 1:200 e as placas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente, a reatividade de IgG4 e IgG1 foi revelada pela adição de 100µl/poço de solução de substrato pNPP (SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate Tablets -SIGMA®, USA), e após 30 minutos a reação foi interrompida com 50µL da solução 3M de NaOH e a absorbância foi medida em leitor de microplacas placas (VersaMax, Molecular Devices, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 405nm.

Para ensaio utilizando anticorpo anti-IgG humana diretamente conjugado com peroxidase a reação foi revelada pela adição de 100µl/poço de tampão Citrato ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  a 0.1M,  $Na_2HPO_4$  a 0.2M, pH 5) contendo substrato OPD (OPD Substrate Tablets, Thermo Scientific, USA) acrescido de peróxido de oxigênio a 0,05M, e após 30 minutos a reação foi parada utilizando 50µL/poço de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  2N) e a absorbância das amostras também foram medidas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 492nm. Em cada placa foram adicionadas amostras de soro de cinco indivíduos verdadeiramente negativos e um verdadeiramente positivo para controle de reação.

A reatividade para cada imunoglobulina e antígeno testado foram determinados por valores de corte obtidos a partir da curva característica de operação do receptor (ROC) e curvas operacionais do receptor de dois gráficos (TG-ROC). A

análise das curvas foi realizada com base em amostras positivas e negativas da população estudada, sendo os controles positivos (n=5) formado por soros de indivíduos com presença de larvas de *S. stercoralis* nas fezes, e os controles negativos (n=30) por amostras de indivíduos copronegativos para ovos, larvas ou cistos de parasitos. O valor de corte para cada ensaio foi estabelecido com base no ponto de intersecção das curvas de sensibilidade e especificidade na análise TG-ROC.

#### **5.2.6** Análise estatística dos dados da população humana

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Open Epi versão 3.01 (Atlanta, EUA), GraphPad Prism versão 8.02 (San Diego, CA, EUA) e Stata 16.0 (College Station, TX, EUA). Os dados foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste estatístico do qui-quadrado foi utilizado para comparar a frequência (%) dos dados categóricos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos. Diferenças com valor de  $p \leq 0,05$  foram consideradas significativas. Com o objetivo de avaliar o desempenho dos diferentes testes parasitológicos de diagnóstico para estrogiloidíase na população humana, foi estabelecido um “Padrão de Referência Consolidado” (CRS), que incluiu todos os indivíduos com presença de larvas características nas fezes avaliadas por qualquer um dos métodos parasitológicos usados (SS, CPA, RMOD e Helmintex). A prevalência global da infecção por *Strongyloides* na área estudada foi calculada como o número de indivíduos positivos identificados por pelo menos um dos testes diagnósticos do CRS dividido pelo número total de participantes (negativos + positivos). A acurácia diagnóstica de cada teste parasitológico e de cada teste sorológico foi comparada com a do CRS calculando-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e concordância (estatística kappa). Para avaliar o grau de concordância entre as diferentes técnicas foi calculado o índice kappa ( $\kappa$ ), que variou de 0 a 1,0 (LANDIS; KOCH 1977).

## **6. RESULTADOS**

---

## 6.1 Modelo experimental

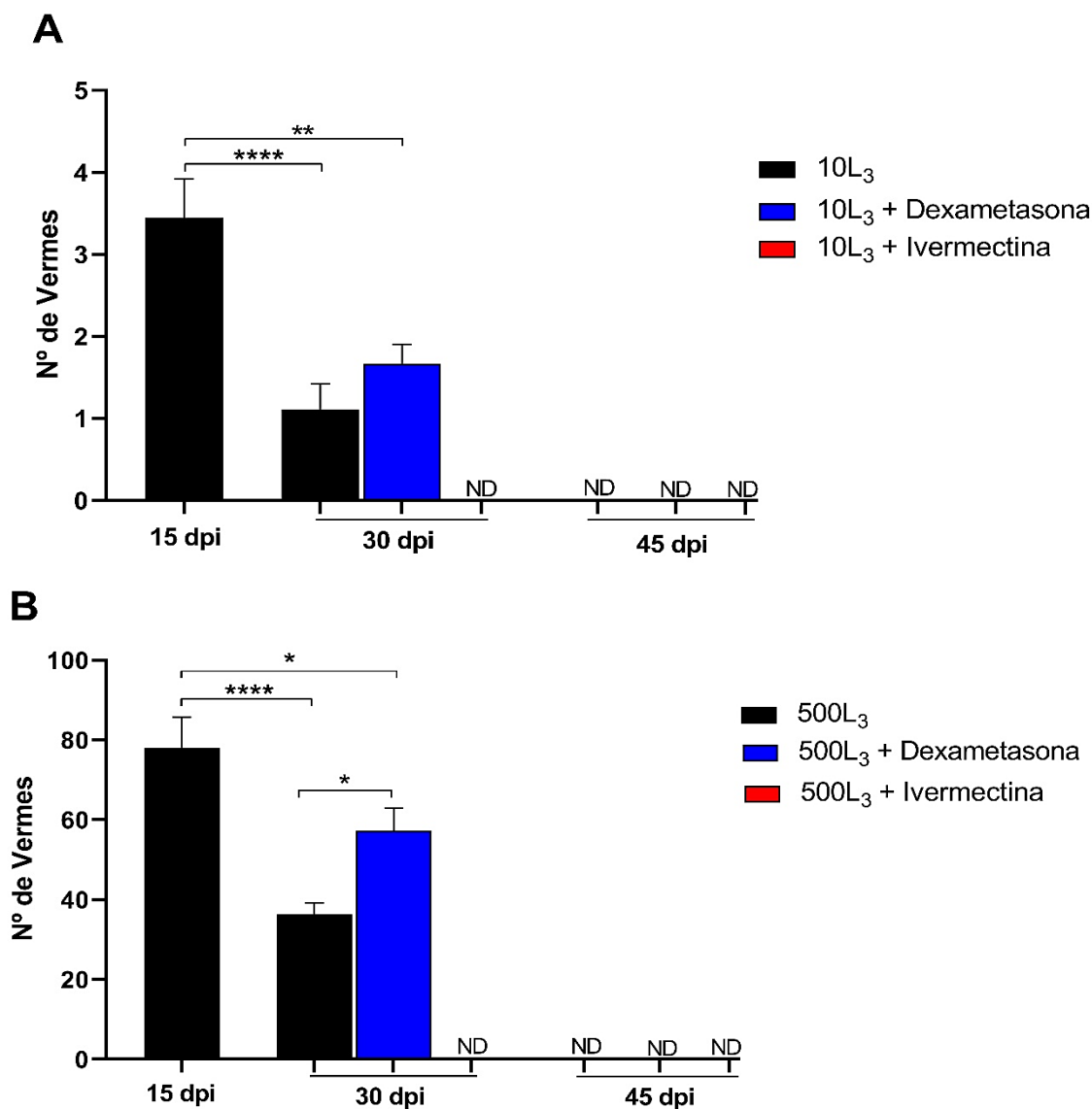
### 6.1.1 Recuperação de vermes adultos para determinação dos períodos de análise no modelo experimental

Para confirmar a persistência da infecção nos diferentes grupos experimentais, a recuperação dos vermes adultos no intestino dos animais infectados foi realizada aos 15, 30 e 45 dias pós infecção (dpi) (**Figuras 14; Tabela 2**). Os dados demonstraram que todos os animais infectados avaliados no 15dpi apresentaram vermes no intestino, com recuperação média de 3.4 ( $\pm 0.4$ ) e 78.1 ( $\pm 7.7$ ), nos grupos 10L<sub>3</sub> e 500L<sub>3</sub>, respectivamente (**Figura 14 e Tabela 2**). Aos 30dpi foi possível verificar uma redução significativa do número de vermes recuperados do intestino de ratos infectados e não tratados, tanto nos ratos infectados com alta carga parasitária (500L<sub>3</sub>) como nos infectados com baixa carga (10L<sub>3</sub>), sendo que no grupo 10L<sub>3</sub> apenas 5 de 7 animais analisados apresentaram vermes no intestino, sugerindo que neste grupo alguns animais infectados já apresentavam o fenômeno de cura-espontânea (**Tabela 2**).

O tratamento dos ratos infectados com dexametasona no 15dpi alterou a cinética de eliminação dos vermes intestinais, especialmente em animais infectados com alta carga parasitária. Nos ratos infectados com 10L<sub>3</sub>, o número médio de vermes recuperados dos animais tratados e não tratados aos 30dpi foi estatisticamente semelhante (**Figura 14A**); entretanto, todos os ratos infectados e tratados com dexametasona ainda apresentavam vermes no intestino, enquanto nos ratos infectados e não tratados cerca de 30% já tinham eliminado a infecção (**Tabela 2**). Por outro lado, nos animais infectados com alta carga (500L<sub>3</sub>), o tratamento com o imunossupressor (500L<sub>3</sub> + Dexametasona) resultou em recuperação de um número médio de vermes significativamente maior que os não tratados, sendo que aos 30dpi ratos infectados e tratados com dexametasona apresentaram 57.3 ( $\pm 5.6$ ) vermes/intestino enquanto que nos animais infectados e não tratados foram recuperados 36.3 ( $\pm 2.8$ ) vermes/intestino (**Figura 14B e Tabela 2**).

Neste mesmo período, 30dpi, todos os animais infectados que receberam tratamento com ivermectina aos 15dpi não apresentaram vermes no intestino, independentemente do número de larvas utilizadas para infecção, demonstrando que o tratamento foi eficaz na cura parasitológica (**Figura 14 e Tabela 2**).

Após 45dpi não foram recuperados vermes intestinais em todos os animais infectados, tratados ou não, indicando a eliminação completa da infecção (**Figura 14 e Tabela 2**).



**Figura 14.** Número médio de vermes recuperados do intestino delgado de ratos da linhagem *Wistar* após 15, 30 e 45 dias de infecção com diferentes cargas de *Strongyloides venezuelensis* e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico.

Os ratos foram infectados subcutaneamente com (A) 10 (baixa carga) ou (B) 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0, e aos 15, 30 ou 45 dias pós-infecção, vermes adultos foram recuperados e quantificados da metade proximal do intestino delgado desses animais. Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no 15dpi em dose de 4mg/Kg/dia via IP durante 3 dias consecutivos; Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no 15dpi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*p<0,05. ND= Não detectado

**Tabela 2. Percentual de infecção e quantidade de vermes recuperados do intestino delgado de ratos da linhagem *Wistar* após 15, 30 e 45 dias de infecção com 10L<sub>3</sub> (baixa carga) ou 500L<sub>3</sub> (alta carga) de *Strongyloides venezuelensis* e tratados ou não com imunossupressor ou antiparasitário.**

Grupos experimentais de baixa carga						
Dias p.i.	10L <sub>3</sub>		10L <sub>3</sub> + Dexametasona		10L <sub>3</sub> + Ivermectina	
	Ratos infectados (%)	Nº de vermes recuperados	Ratos infectados (%)	Nº de vermes recuperados	Ratos infectados (%)	Nº de vermes recuperados
15	7/7 (100%)	3.4 ±0.4	7/7 (100%)	3.4 ±0.4	7/7 (100%)	3.4 ±0.4
30	5/7 (71.4%)	1.1 ±0.3	7/7 (100%)	1.7 ±0.2	0/7 (0%)	0
45	0/7 (0%)	0	0/7 (0%)	0	0/7 (0%)	0

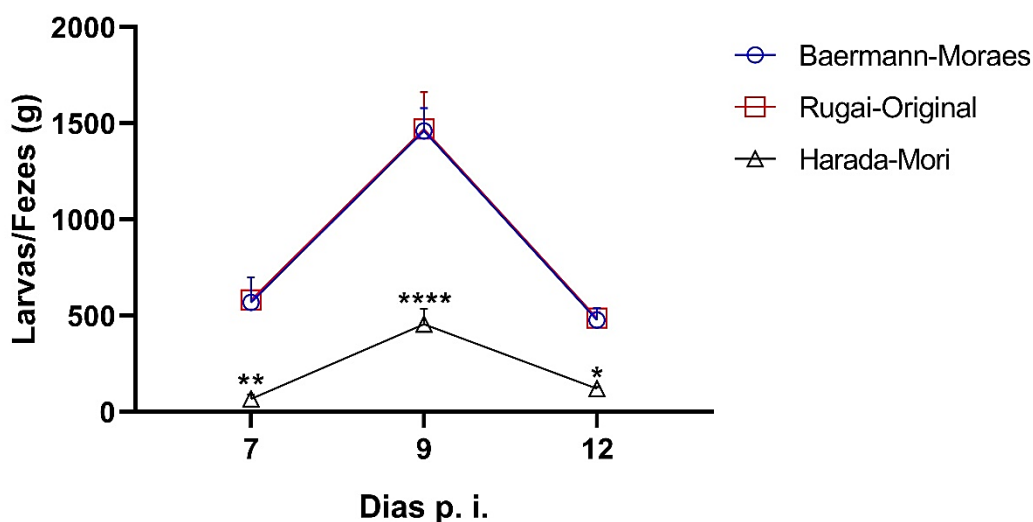
  

Grupos experimentais de alta carga						
Dias p.i.	500L <sub>3</sub>		500L <sub>3</sub> + Dexametasona		500L <sub>3</sub> + Ivermectina	
	Ratos infectados (%)	Nº de vermes recuperados	Ratos infectados (%)	Nº de vermes recuperados	Ratos infectados (%)	Nº de vermes recuperados
15	7/7 (100%)	78.1 ±7.7	7/7 (100%)	78.1 ±7.7	7/7 (100%)	78.1 ±7.7
30	7/7 (100%)	36.3 ±2.8	7/7 (100%)	57.3 ±5.6	0/7 (0%)	0
45	0/7 (0%)	0	0/7 (0%)	0	0/7 (0%)	0

Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no 15dpi por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no 15dpi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM). n= 7 ratos/grupo. Ratos infectados (%) = Taxa de infecção é representada pelo número de ratos com vermes adultos do parasito no intestino delgado/número total de ratos avaliados, e entre parênteses a porcentagem de ratos que apresentaram vermes adultos.

### 6.1.2 Avaliação e seleção do método parasitológico de concentração para uso ao longo do trabalho em modelo experimental

A **Figura 15** apresenta as técnicas parasitológicas de concentração que foram inicialmente testadas com intuito de selecionar a técnica com melhor eficácia para a detecção de larvas de *Strongyloides* sp a partir das amostras de fezes recuperadas de ratos experimentalmente infectados com 2000 larvas, em três diferentes dias de pós infecção. Avaliando a mesma quantidade de fezes, o método de Rugai apresentou recuperação de larvas semelhante ao recuperado utilizando a técnica Baermann-Moraes, enquanto a técnica de Harada-Mori apresentou recuperação de larvas significativamente menor em todos os dias de avaliação (**Figura 15**). Além da baixa eficácia na detecção de larvas, a técnica de Harada-Mori também demanda tempo de realização mais longo, dificultando o seu uso em grande demanda de amostras.



**Figura 15. Avaliação da eficácia das técnicas de Baermann-Moraes, Rugai e Harada-Mori na recuperação de larvas de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de ratos experimentalmente infectados.**

Foram utilizadas fezes de ratos *Wistar* infectados subcutaneamente com 2000 larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Aos 7, 9 e 12 dias de infecção foram feitas coletas de fezes de cada animal, e analisadas por três diferentes técnicas parasitológicas de concentração. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão (SEM) e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.  $n = 3$  ratos. \* $p < 0,05$  em relação a técnica de Baermann-Moraes.

Entre as duas técnicas com maior sensibilidade na recuperação de larvas, selecionamos a técnica de concentração de Rugai para ser utilizada no estudo experimental. Essa técnica apresentou melhor eficiência de recuperação de larvas, e facilidade de realização e adaptação quando empregado a um grande número de amostras. Selecionando este método, foi possível realizar melhorias na técnica com materiais de baixo custo e de simples obtenção no mercado, para avaliar seu desempenho em comparação à técnica original.

### 6.1.3 Avaliação da eficácia do diagnóstico entre as técnicas de Rugai-original e modificado

A **Tabela 3** representa os dados de recuperação de larvas de *S. venezuelensis* utilizando as técnicas de Rugai-modificada (RMOD) e de Rugai-original (RO) nas mesmas amostras de fezes recuperadas de ratos experimentalmente infectados com 500 larvas infectantes/animal, avaliados ao longo de 45 dias de infecção experimental. Em relação à técnica de Rugai original, a técnica modificada recuperou um número significativamente maior de larvas do parasito nas amostras de fezes em todos os pontos avaliados até o 35<sup>o</sup> dia pós-infecção (**Tabela 3**). Entre 40 e 45 dpi, não foram



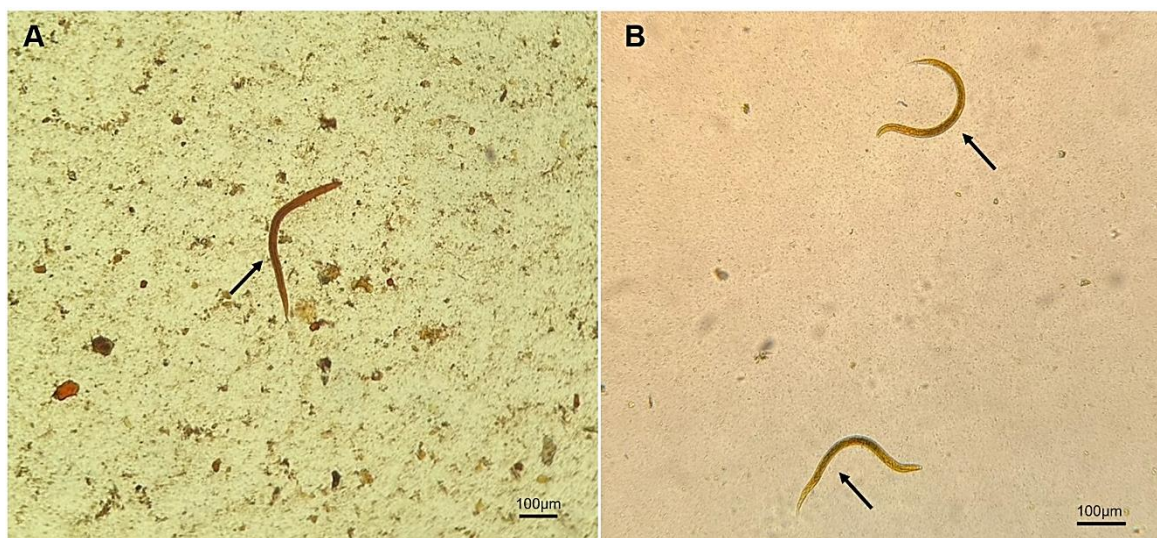
mais detectadas larvas nas fezes dos animais em ambas as técnicas utilizadas. A recuperação larval média pela técnica RMOD no decorrer de todo o protocolo experimental foi 4,6 vezes maior que pela técnica RO, e esta diferença aumentou até 10 vezes aos 35 dpi, momento em que um número muito baixo de larvas estava sendo eliminado nas fezes (**Tabela 3**).

Além disso, é importante destacar que utilizando a técnica RMOD conseguimos detectar a eliminação larval por um período prolongado. Especificamente, aos 35 dpi, quando a maioria dos vermes adultos já foram eliminados (Baek *et al.* 2003), a frequência de detecção de animais positivos para a presença de ovos/larvas por RO foi de apenas 28,6%, enquanto o RMOD revelou que 85,7 % dos ratos infectados experimentalmente ainda apresentavam ovos/larvas nas fezes (**Tabela 3**). Estes dados indicam uma melhor sensibilidade da técnica RMOD na identificação de um pequeno número de larvas em exames de fezes. Além disso, a técnica RMOD permitiu obter sedimentos finais mais limpos, facilitando a localização e contagem das larvas eliminadas (**Figura 16**).

**Tabela 3. Avaliação da eficácia das técnicas Rugai original (RO) e Rugai modificada (RMOD) na recuperação de larvas do parasito em fezes de ratos em diferentes momentos após infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis*.**

Dias após infecção	Rugai Original (RO)		Rugai-Modificado (RMOD)		Desempenho do RMOD <sup>b</sup>	p valor
	Ratos infectados (%) <sup>a</sup>	Carga parasitária	Ratos infectados (%) <sup>a</sup>	Carga parasitária		
5	7/7 (100%)	115.3 ±12.9	7/7 (100%)	436.1 ±66.1	3.78	0.0005*
10	7/7 (100%)	1,497.3 ±233.1	7/7 (100%)	3,972.2 ±468.0	2.65	0.0005*
15	7/7 (100%)	1,010 ±74.4	7/7 (100%)	2,812.1 ±278.5	2.78	0.0001*
20	7/7 (100%)	650.8 ±110.3	7/7 (100%)	1,888.9 ±170.7	2.90	0.0001*
25	7/7 (100%)	272.5 ±29.6	7/7 (100%)	1,049.3 ±269.0	3.85	0.0141*
30	7/7 (100%)	94.9 ±12.2	7/7 (100%)	298.0 ±50.5	3.14	0.0021*
35	2/7 (28.6%)	4.1 ±2.6	6/7 (85.7%)	43.2 ±15.4	10.6	0.0277*
40	0/7 (0%)	0	0/7 (0%)	0	-	-
45	0/7 (0%)	0	0/7 (0%)	0	-	-

a= Taxa de infecção é representada pelo número de ratos com larvas do parasito nas fezes/número total de ratos avaliados, e entre parênteses a porcentagem de infectados em cada momento. b= Taxa de larvas do parasito recuperadas pela técnica RMOD em comparação com o RO. \* Número de larvas do parasito significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) em relação a comparação das amostras fecais dos mesmos ratos experimentalmente infectados e avaliados por RO e RMOD no mesmo momento da infecção.



**Figura 16. Condição representativa do sedimento final obtido a partir das técnicas Rugai original (RO) e modificado (RMOD).**

Os ratos foram infectados no dia 0 com 500 L<sub>3</sub> de *S. venezuelensis* e os exames parasitológicos foram realizados pelas técnicas RO (A) e RMOD (B) utilizando 1 g de amostras fecais coletadas do mesmo rato infectado experimentalmente aos 15 dias pós-infecção. Alíquotas de 100 µL de cada amostra foram analisadas em microscópio óptico (Nikon). O campo de observação das larvas (indicadas pelas setas) em B são mais limpas e mais fáceis de identificar. Barras de escala = 100 µm

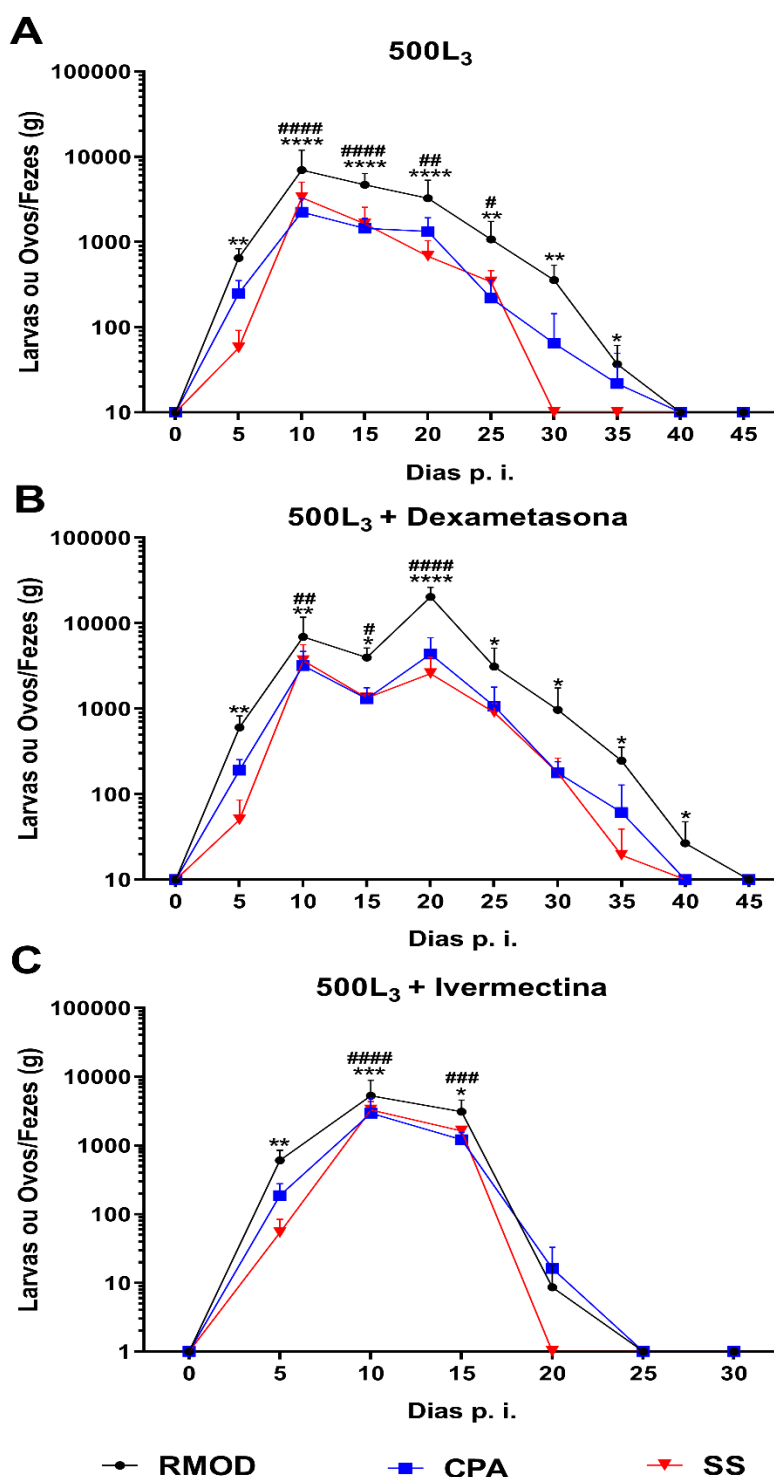
#### 6.1.4 Avaliação comparativa da eficácia do diagnóstico pela técnica de Rugai-modificada em relação a diferentes técnicas parasitológicas

Em comparação à outras técnicas parasitológicas que também permitem a identificação de larvas de nematódeos em amostras fecais, a técnica de Rugai-modificada (RMOD) também se mostrou a mais sensível das técnicas parasitológicas utilizadas na avaliação da cinética de infecção por *S. venezuelensis* durante os 45 dias do protocolo experimental (**Figuras 17 e 18**).

Em ratos infectados com 500L<sub>3</sub> e sem tratamento, a técnica RMOD detectou número maior de larvas do parasito nas amostras de fezes analisadas em comparação às técnicas de sedimentação espontânea (SS) e cultura em placa de ágar (CPA) sendo que, para SS, a diferença foi estatisticamente significativa entre os 5 e 40dpi e, para CPA, houve diferença significativa de 10 a 25dpi (**Figura 17A**). A técnica de RMOD também permitiu identificar um percentual maior de animais infectados nos dias 5, 30 ou 35 em relação a SS, sendo os dois últimos pontos citados, significativamente diferentes ( $p < 0.02$  ou  $p < 0.04$ , respectivamente); e nos 30 ou 35dpi, quando comparado a cultura em placa, porém sem diferença estatística (**Tabela 4**).

Nos animais infectados com 500L<sub>3</sub> e que foram imunossuprimidos ao 15dpi, a contagem do número larvas nas fezes obtida pela utilização da técnica RMOD também foi significativa superior quando comparado à SS e à CPA (**Figura 17B**).

Para os animais infectados com alta carga e tratados com ivermectina no 15dpi, o número de larvas identificadas pela técnica modificada também foi significativamente maior em comparação à SS e CPA até o 15 dpi (**Figura 17C**). É importante verificar que aos 20dpi, após o tratamento com ivermectina, a técnica SS não detectou ovos/larvas nas fezes; entretanto, as técnicas de concentração de larvas, tanto Rugai como cultura em placa, demonstraram a presença de larvas, indicando que a infecção ainda estava ativa.



**Figura 17. Avaliação da eficácia das técnicas de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) na recuperação de larvas e/ou ovos em fezes de ratos da linhagem *Wistar* infectados com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico.**

(A) Animais apenas infectados. (B) Animais infectados e tratados com Dexametasona no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias. (C) Animais infectados e tratados com Ivermectina no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. As análises foram realizadas em diferentes pontos ao longo de 45 dias pós infecção. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*p<0,05= em comparação a SS; #p<0,05= em comparação a CPA.

**Tabela 4. Taxas de detecção de infecção obtidas pela técnica de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) em ratos *Wistar* infectados com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico analisados em diferentes períodos.**

500L <sub>3</sub>					
Dias p.i.	RMOD Infectado/total (%)	CPA Infectado/total (%)	SS Infectado/total (%)	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
5	7/7 (100%)	7/7 (100%)	5/7 (71,4%)	0	0,695
10	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
15	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
20	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
25	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
30	7/7 (100%)	4/7 (57,1%)	0/7 (0%)	0,530	0,029*
35	6/7 (85,7%)	3/7 (42,9%)	0/7 (0%)	0,474	0,044*
40	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0
45	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0
500L <sub>3</sub> + Dexametasona					
Dias p.i.	RMOD Infectado/total (%)	CPA Infectado/total (%)	SS Infectado/total (%)	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
5	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/7 (85,7%)	0	0,853
10	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
15	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
20	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
25	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
30	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/7 (85,7%)	0	0,853
35	7/7 (100%)	5/7 (71,4%)	4/7 (57,1%)	0,695	0,530
40	5/7 (71,4%)	2/7 (28,6%)	0/7 (0%)	0,401	0,068
45	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0
500L <sub>3</sub> + Ivermectina					
Dias p.i.	RMOD Infectado/total (%)	CPA Infectado/total (%)	SS Infectado/total (%)	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
5	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/7 (85,7%)	0	0,853
10	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
15	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
20	4/7 (57,1%)	4/7 (57,1%)	0/7 (0%)	0	0,107
25	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0
30	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0

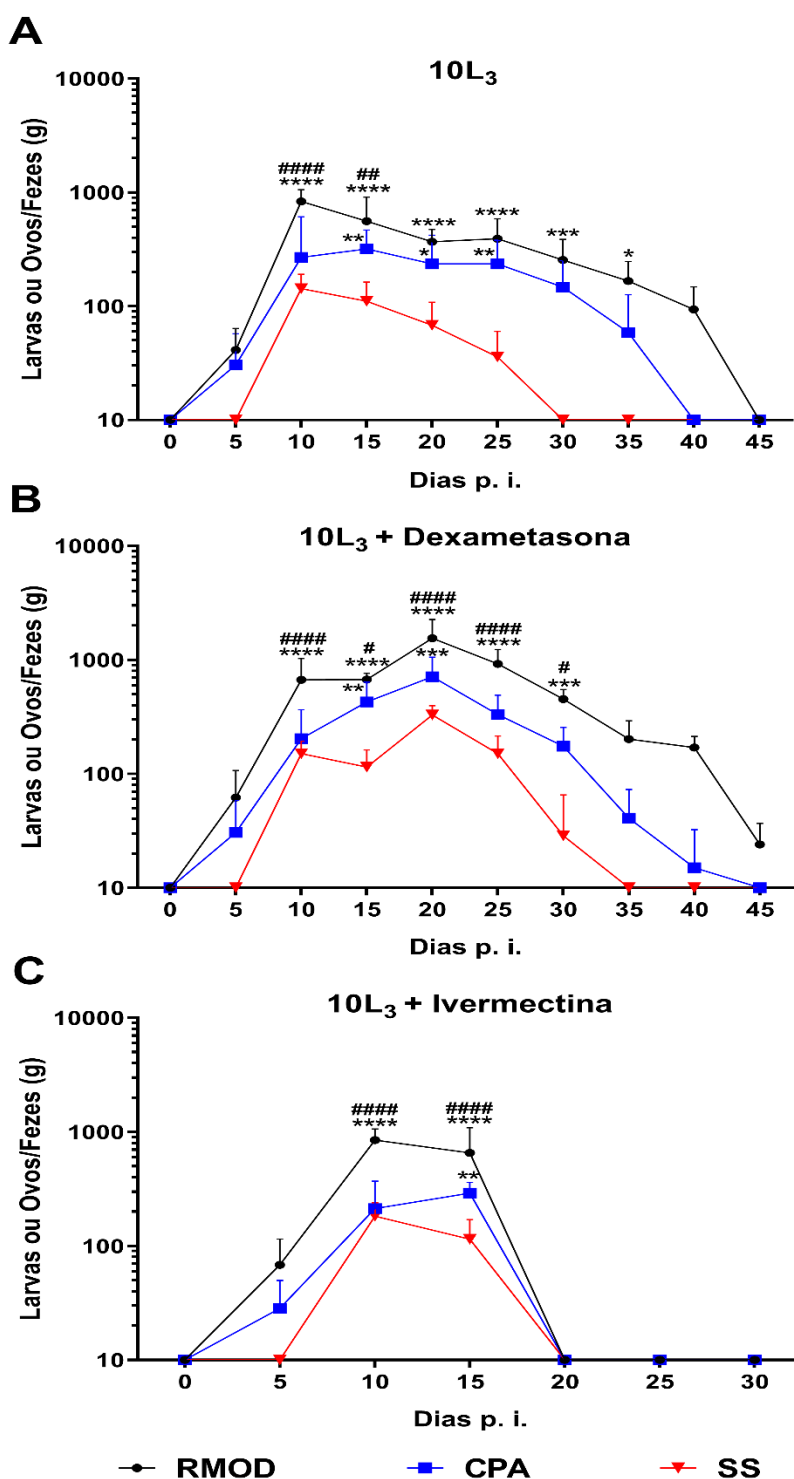
a=comparação entre Rugai-modificado (RMOD) e Cultura em placa de ágar (CPA). b= comparação entre RMOD e Sedimentação espontânea (SS). p= valor obtido pelo teste do Fisher. \*estatisticamente significativo (p<0,05).

Nos grupos com baixa carga de infecção (**Figura 18**), a técnica modificada de Rugai também resultou em recuperação de larvas significativamente maior que a técnica de sedimentação em quase todos os pontos examinados, mesmo utilizando a mesma quantidade de fezes. Em comparação ao método de cultura fecal em placa, a técnica de Rugai modificada também foi responsável por uma recuperação significativamente maior de larvas aos 10 e 15dpi (**Figura 18A**). Estas diferenças são especialmente importantes no período final da infecção, onde a eliminação de larvas

diminui muito, sendo verificado ausência de larvas do parasito pela técnica de sedimentação a partir de 30dpi e para a técnica de cultura em placa a partir de 40dpi; entretanto, neste mesmo período foram recuperadas larvas nas fezes de todos os animais infectados quando utilizamos a técnica RMOD, resultando em uma frequência de animais infectados significativamente maior (**Figura 18A e Tabela 5**)

Nos animais infectados e imunossuprimidos, o número de larvas recuperadas das fezes foi maior, facilitando o diagnóstico pelas diferentes técnicas; entretanto, a contagem do número larvas pela técnica modificada foi superior entre 10 e 30dpi, quando comparada às outras duas técnicas utilizadas (**Figura 18B**). Além disso, a frequência de animais infectados pela técnica modificada foi maior nos dias 5, 35, 40 e 45 pós infecção em comparação a SS ( $p<0.04$ ) e em relação à CPA, com diferença significativa ( $p<0.04$ ) no último ponto analisado (**Tabela 5**).

Os animais infectados e tratados com ivermectina aos 15dpi não apresentaram larvas nas fezes aos 20dpi, independente da técnica parasitológica utilizada, mas a recuperação do número de larvas pela técnica modificada foi maior nos dias 10 e 15 pós infecção em comparação a SS, e apenas no 15dpi em relação a CPA (**Figura 18C**).



**Figura 18.** Avaliação da eficácia entre as técnicas de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) na recuperação de larvas e/ou ovos em fezes de ratos da linhagem *Wistar* infectados com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmântico.

(A) Animais apenas infectados. (B) Animais infectados e tratados com Dexametasona no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias. (C) Animais infectados e tratados com Ivermectina no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. As análises foram realizadas em diferentes pontos ao longo de 45 dias pós infecção. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*p<0,05= em comparação a SS; #p<0,05= em comparação a CPA.

**Tabela 5. Taxas de detecção de infecção obtidas pela técnica de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) em ratos *Wistar* infectados com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e tratados ou não com imunossupressor ou anti-helmíntico analisados em diferentes períodos.**

10L <sub>3</sub>					
Dias	RMOD	CPA	SS	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
p.i.	Infectado/total (%)	Infectado/total (%)	Infectado/total (%)		
5	7/7 (100%)	6/7 (85,7%)	0/7 (0%)	0,853	0,029*
10	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
15	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
20	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
25	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/7 (85,7%)	0	0,853
30	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)	0	0,029*
35	7/7 (100%)	5/7 (71,4%)	0/7 (0%)	0,695	0,029*
40	7/7 (100%)	3/7 (42,9%)	0/7 (0%)	0,474	0,029*
45	4/7 (57,1%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0,107	0,107
10L <sub>3</sub> + Dexametasona					
Dias	RMOD	CPA	SS	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
p.i.	Infectado/total (%)	Infectado/total (%)	Infectado/total (%)		
5	7/7 (100%)	4/7 (57,1%)	0/7 (0%)	0,530	0,029*
10	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
15	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
20	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
25	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
30	7/7 (100%)	7/7 (100%)	4/7 (57,1%)	0	0,530
35	7/7 (100%)	5/7 (71,4%)	0/7 (0%)	0,695	0,029*
40	7/7 (100%)	4/7 (57,1%)	0/7 (0%)	0,530	0,029*
45	6/7 (85,7%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0,044*	0,044*
10L <sub>3</sub> + Ivermectina					
Dias	RMOD	CPA	SS	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
p.i.	Infectado/total (%)	Infectado/total (%)	Infectado/total (%)		
5	7/7 (100%)	5/7 (71,4%)	0/7 (0%)	0,695	0,029*
10	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
15	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	0	0
20	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0
25	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0
30	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0	0

a=comparação entre Rugai-modificado (RMOD) e Cultura em placa de ágar (CPA). b= comparação entre RMOD e Sedimentação espontânea (SS). p= valor obtido pelo teste do Fisher. \*estatisticamente significativo (p<0,05).

### 6.1.5 Avaliação da leucometria global e diferencial

O número de leucócitos totais e diferenciais presentes na circulação sanguínea de ratos dos diferentes grupos experimentais demonstraram que a infecção e os diferentes tratamentos alteraram o perfil das células circulantes (**Figura 19 e 20**).

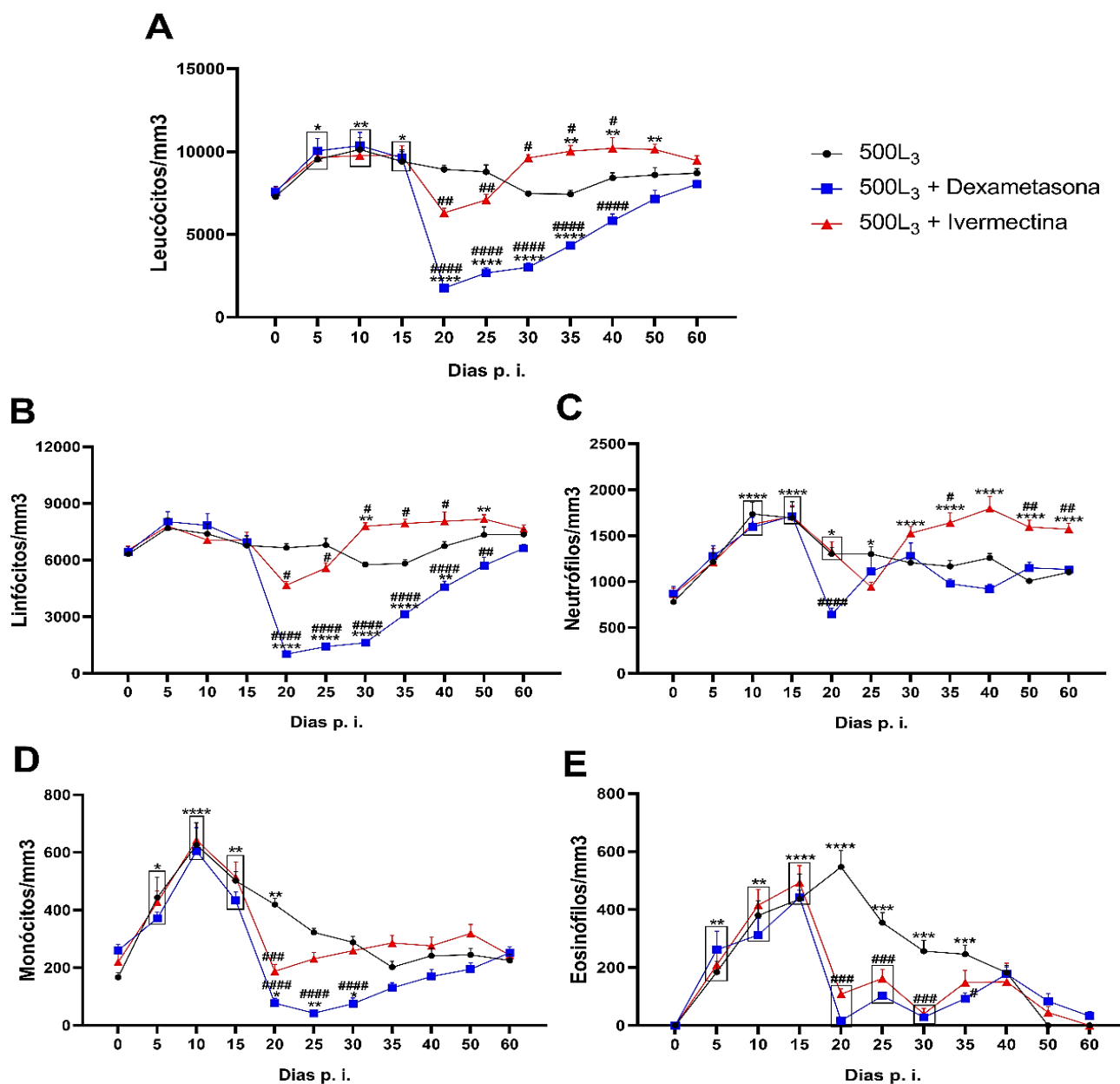
Em relação ao tempo inicial (dia zero), o grupo infectado com alta carga e sem tratamento apresentou um aumento significativo do número de leucócitos circulantes



nos dias 5, 10 e 15 pós infecção, retornando aos níveis basais a partir de 20dpi (**Figura 19A**). Esse aumento foi resultado da elevação significativa de neutrófilos (**Figura 19C**), monócitos (**Figura 19D**) e eosinófilos (**Figura 19E**), sendo que este último tipo celular permaneceu significativamente elevado durante todo o período da infecção. Todavia, não foram observadas alterações significativas no número de linfócitos circulantes (**Figura 19B**).

Os animais infectados e tratados com dexametasona no 15dpi tiveram redução acentuada do número de leucócitos entre os dias 20 e 35 pós infecção em relação ao dia 0 (**Figura 19A**). Essa redução também foi observada de forma significativa no número de linfócitos (**Figura 19B**), monócitos (**Figura 19D**) e eosinófilos (**Figura 19E**). O número de neutrófilos não apresentou alterações significativas nesse grupo imunossuprimido, exceto em 20dpi, que teve redução quando comparado ao grupo 500L<sub>3</sub> (**Figura 19C**).

O grupo infectado que recebeu tratamento com Ivermectina ao 15dpi teve aumento significativo do número de leucócitos circulantes nos 35, 40 e 50dpi quando comparado ao dia 0 e ao grupo apenas infectado (**Figura 19A**). Esse aumento também foi evidenciado no número de linfócitos (**Figura 19B**) e neutrófilos (**Figura 19C**), onde esse último permaneceu significativamente elevado até o último dia de análise. No entanto, esse grupo tratado com anti-helmíntico, em comparação ao grupo 500L<sub>3</sub>, apresentou redução significativa do número de monócitos no 20dpi (**Figura 19D**) e, principalmente, do número de eosinófilos aos 20, 25 e 30dpi (**Figura 19E**), sugerindo essa célula como marcador de infecção ativa, uma vez que sua redução aconteceu após eliminação do parasito.



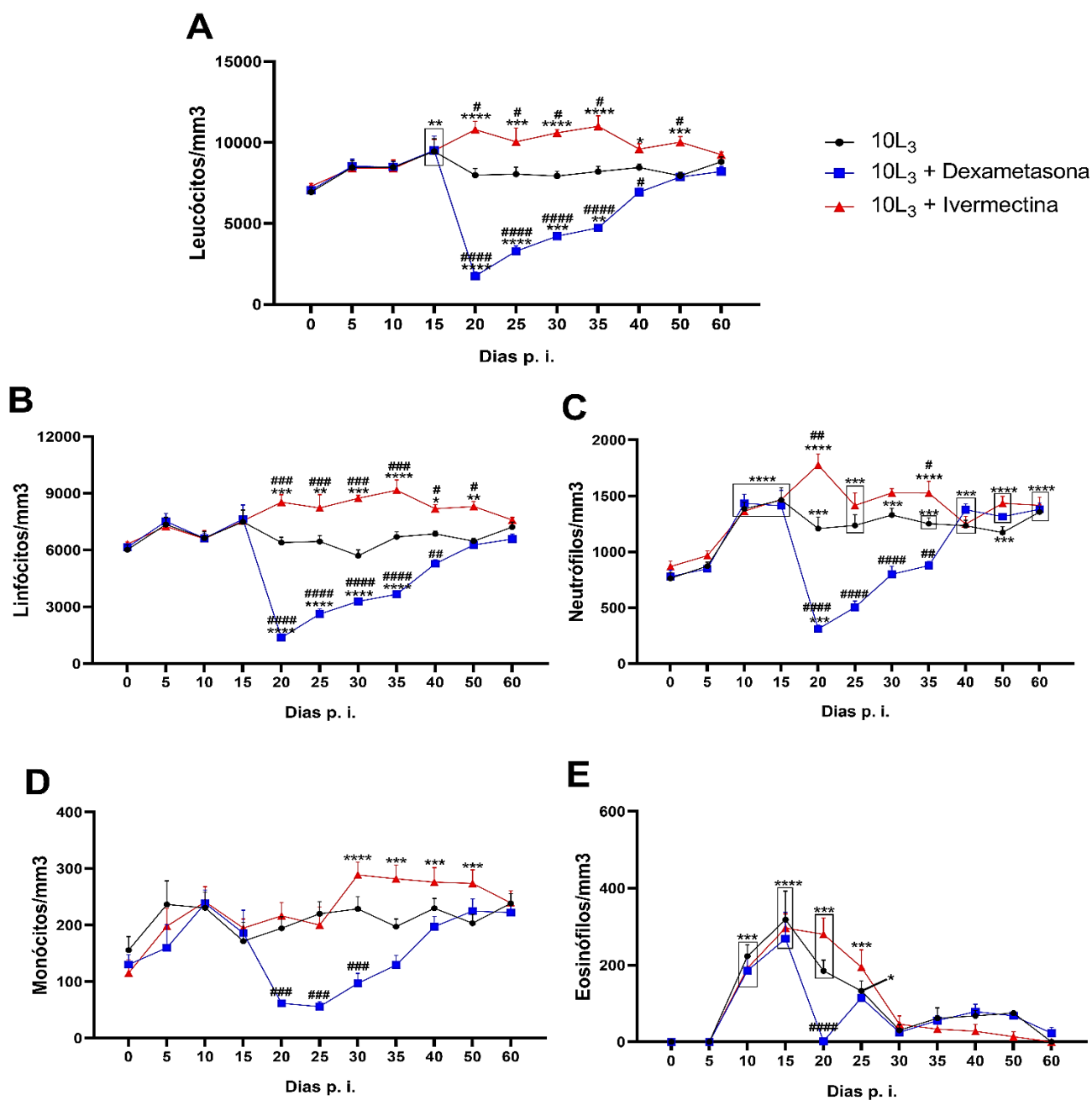
**Figura 19. Contagem de leucócitos totais e diferenciais presente na corrente sanguínea de ratos *Wistar* durante a infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. Número de leucócitos totais (A), linfócitos (B), neutrófilos (C), monócitos (D) e eosinófilos (E).**

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e contagem de leucócitos. Grupo 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*= $p < 0,05$  em relação ao dia 0; #= $p < 0,05$  em relação ao 500L<sub>3</sub>.

Em contraste as alterações observadas em animais infectados com alta carga parasitária, os ratos infectados com 10L<sub>3</sub> apresentaram um aumento significativo nos leucócitos circulantes somente após 15dpi, retomando aos níveis basais logo em seguida (**Figura 20A**). Entretanto, o número de neutrófilos (**Figura 20C**) e eosinófilos (**Figura 20E**) circulantes tiveram aumento significativo a partir do 10dpi, em relação ao dia 0. Nesse grupo apenas infectado (10L<sub>3</sub>), o aumento de neutrófilos foi evidenciado até o último dia de análise (**Figura 20C**); em contrapartida, o número de eosinófilos permaneceu elevado até o 25dpi, e retomando aos níveis basais em seguida. Além disso, não foi observado alterações significativas no número de linfócitos (**Figura 20B**) e monócitos (**Figura 20C**) circulantes.

Os animais infectados com baixa carga e que receberam dexametasona no 15dpi, apresentaram redução expressiva do número de leucócitos do 20 ao 35dpi, em relação ao dia 0 (**Figura 20A**). Essa redução foi observada em todos os leucócitos diferenciais após tratamento com dexametasona (**Figura 20B a E**). Porém, somente nos linfócitos essa redução se manteve forma significativa até o 35dpi (**Figura 20B**). Nesse grupo imunossuprimido também houve redução de leucócitos totais e dos diferenciais após 15dpi, em comparação ao grupo apenas infectado, com retorno aos níveis normais apenas entre 40 e 50dpi (**Figura 20**).

O grupo infectado e tratado com ivermectina no 15dpi, demonstrou aumento significativo do número de leucócitos entre os dias 20 a 50pi, em comparação ao dia 0 e também em comparação aos animais somente infectados (**Figura 20A**). Esse aumento expressivo também foi observado no número de linfócitos (**Figura 20B**), neutrófilos (**Figura 20C**) e monócitos (**Figura 20D**) durante todo o período da infecção. De forma diferente, após tratamento com anti-helmíntico, o número de eosinófilos apresentou redução progressiva, retomando aos níveis basais a partir do 30dpi (**Figura 20E**).



**Figura 20. Contagem de leucócitos total e diferencial presente na corrente sanguínea de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. Número de leucócitos totais (A), linfócitos (B), neutrófilos (C), monócitos (D) e eosinófilos (E).**

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 10 (baixa carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e contagem de leucócitos. Grupo 10L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*= $p < 0,05$  em relação ao dia 0; #= $p < 0,05$  em relação ao 10L<sub>3</sub>.

### 6.1.6 Reatividade relativa de IgM a diferentes extratos antigênicos de *S. venezuelensis*

O aumento dos níveis de IgM parasito-específica no plasma dos ratos infectados com alta carga parasitária e submetidos ao tratamento com dexametasona ou com ivermectina no decorrer de 60 dias de procedimento está ilustrado na **Figura 21**.

Em relação ao período anterior à infecção, a reatividade de IgM ao antígeno solúvel de L<sub>3</sub> aumentou significativamente a partir de 5 dias da infecção, e se elevou em todos os grupos infectados com alta carga (**Figura 21A**). Nos animais somente infectados, a reatividade IgM anti-L<sub>3</sub> aumentou progressivamente até o 15dpi e se manteve elevado até 30dpi, reduzindo progressivamente após este período (**Figura 21A**). Por outro lado, os ratos que receberam dexametasona mostraram uma pequena redução dos níveis de reatividade de IgM anti-L<sub>3</sub> aos 20dpi, seguido de um aumento de reatividade entre 25 e 30dpi, sendo que aos 30dpi a reatividade de IgM anti-L<sub>3</sub> nesse grupo experimental foi maior que nos demais grupos. A partir de 35 dpi, ratos infectados e tratados com dexametasona mostraram uma redução progressiva de IgM anti-L<sub>3</sub> mas, assim como os somente infectados, esta reatividade não retorna aos níveis basais durante o período analisado (**Figura 21A**). Nos ratos infectados e tratados com ivermectina aos 15dpi, protocolo experimental que resultou na completa eliminação dos vermes, o nível de reatividade de IgM anti-L<sub>3</sub> começa a reduzir aos 20dpi, sendo que aos 25dpi o nível de reatividade no plasma dos animais deste grupo experimental foi significativamente menor que nos demais ratos infectados. Apesar da redução de reatividade precoce e progressiva, a reatividade de IgM anti-L<sub>3</sub> no plasma dos ratos infectados e tratados com ivermectina também não retornam aos níveis basais durante o período avaliado (**Figura 21A**).

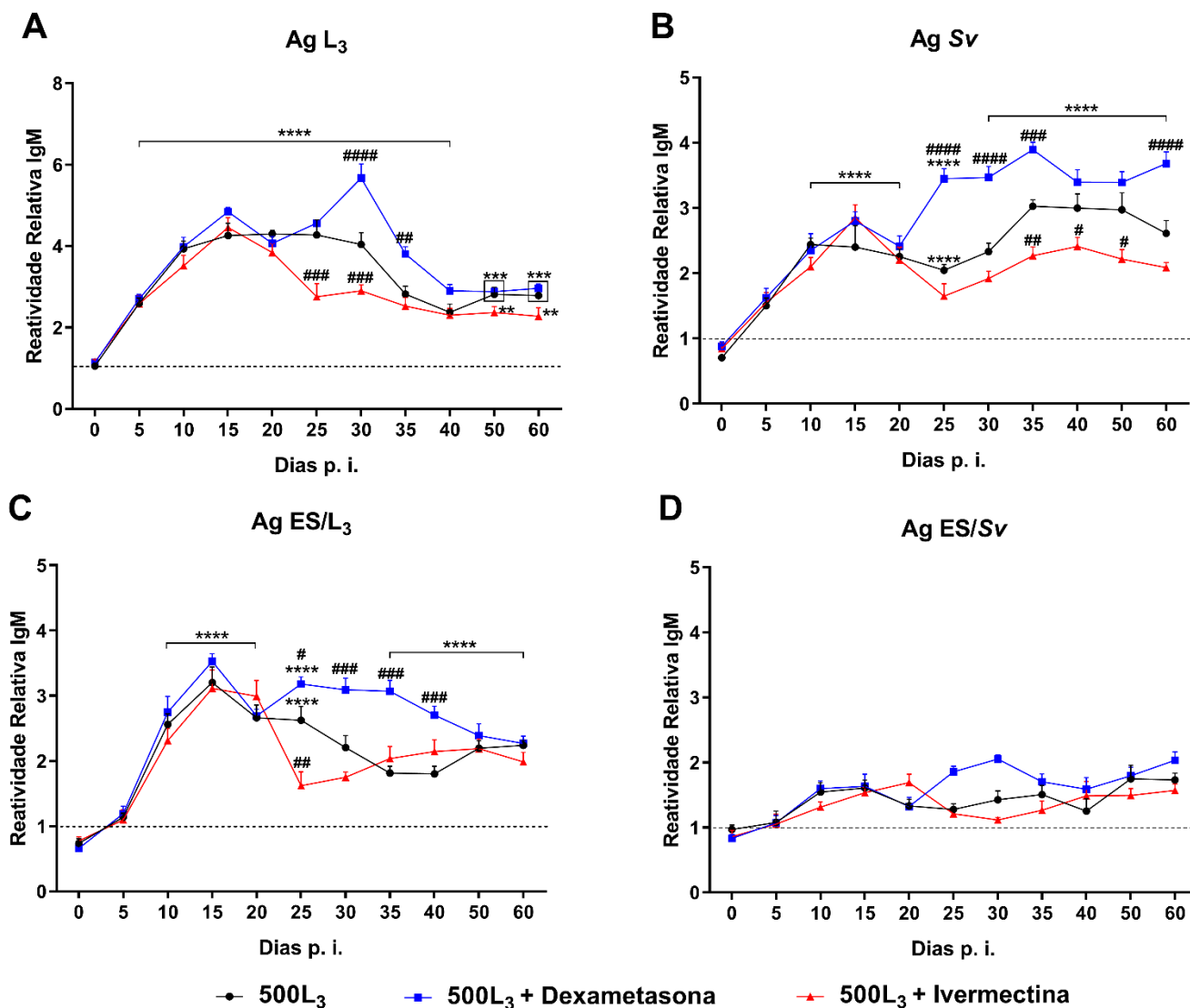
Quanto aos níveis de reatividade IgM ao antígeno de verme, todos os grupos infectados tiveram aumento significativo desde anticorpo a partir de 10dpi (**Figura 21B**). Nos animais infectados e sem tratamento a reatividade de IgM anti-verme permaneceu elevada até o último dia examinado (**Figura 21B**). Em contrapartida, os animais infectados e imunossuprimidos mostraram uma leve redução dos níveis de IgM anti-verme no 20dpi, seguido de aumento expressivo deste anticorpo entre os dias 25 ao 60pi, sendo inclusive superior aos outros grupos infectados (**Figura 21B**). Os animais infectados e tratados com anti-helmíntico apresentaram redução dos níveis de IgM anti-verme após tratamento, sendo que aos 35, 40 e 50dpi essa redução

foi significativa em relação aos outros grupos infectados. Entretanto, a reatividade de IgM anti-verme não retomou aos níveis basais durante esse período avaliado (**Figura 21B**).

A reatividade de IgM ao antígeno excreto/secretado de L<sub>3</sub> aumentou nos animais infectados a partir de 10dpi (**Figura 21C**). Os animais apenas infectados tiveram pico de reatividade IgM anti-ES/L<sub>3</sub> no 15dpi e, posteriormente, uma redução gradual até o último dia avaliado, porém sem retorno aos níveis normais (**Figura 21C**). Os ratos infectados que receberam tratamento com dexametasona, assim como nos outros antígenos, a reatividade IgM anti-ES/L<sub>3</sub> apresentou pequena queda no 20dpi, mas seguido de um aumento gradual aos 25, 30 e 35dpi, sendo maior quando comparado aos outros grupos. Nesse grupo experimental ocorreu redução progressiva de IgM anti-ES/L<sub>3</sub> a partir do 40dpi, porém, também sem retornar aos níveis basais (**Figura 21C**). E nos animais que receberam tratamento com ivermectina ao 15dpi, a reatividade IgM anti-ES/L<sub>3</sub> apresentou redução a partir do 20dpi, com diferença significativa ao 25dpi em relação aos outros grupos. No entanto, apesar da reatividade nesse grupo não retornar aos níveis basais, ela se manteve menor e estável até o último dia avaliado (**Figura 21C**).

A reatividade de IgM a antígenos excreto/secretado de verme adulto é baixa no plasma dos animais infectados dos diferentes grupos experimentais e sofre poucas alterações durante os 60 dias avaliados, sugerindo que este ensaio não teria valor para diagnóstico desta parasitose (**Figura 21D**).

## IgM



**Figura 21.** Níveis de IgM parasito-específica no plasma de ratos *Wistar* durante a infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgM reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).

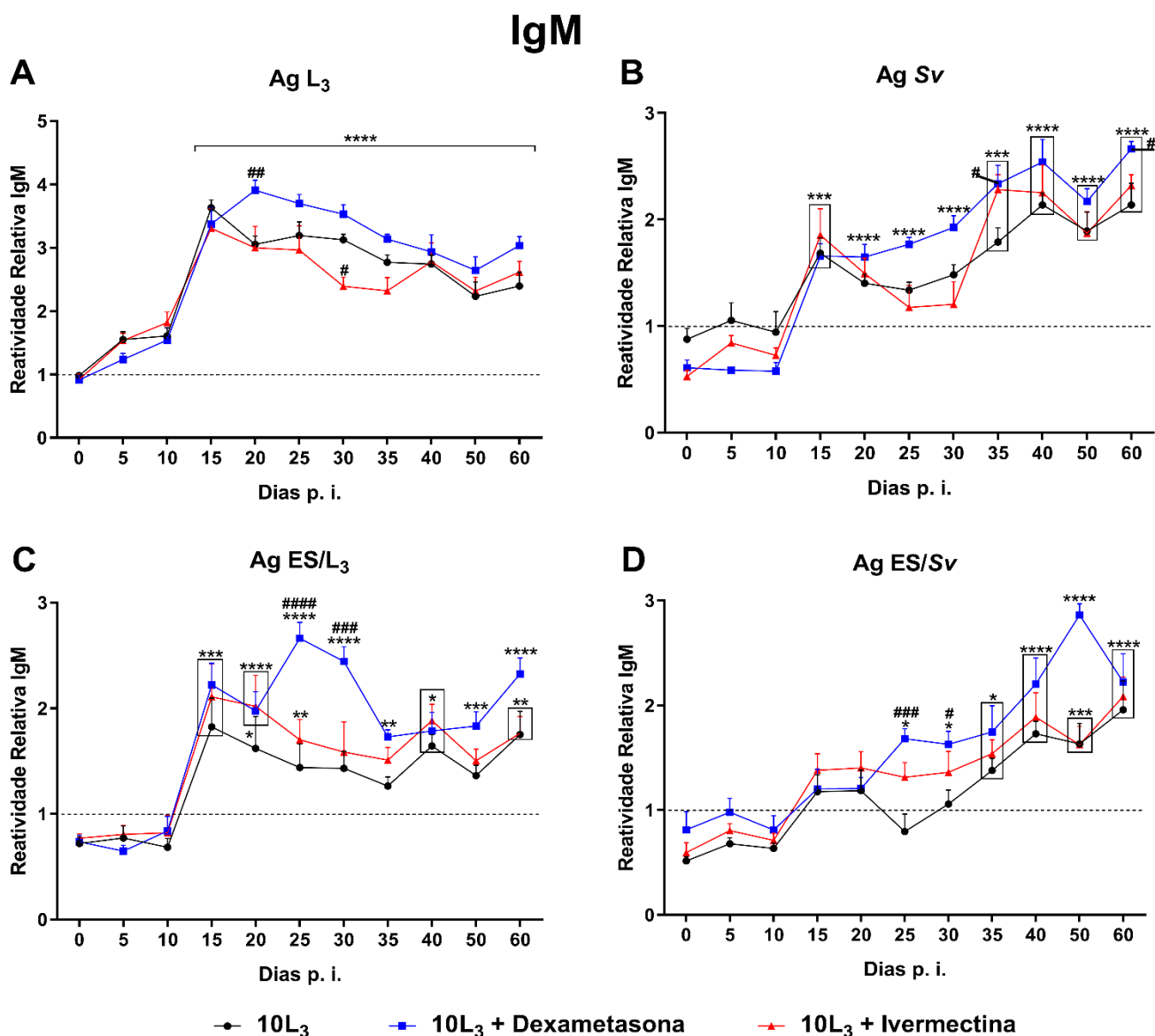
Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \* = p < 0,05 em relação ao dia 0; # = p < 0,05 em relação ao 500L<sub>3</sub>.

Como o maior problema de diagnóstico da estrogiloidíase em humanos é a falta de sensibilidade dos testes para detectar baixa carga parasitária, neste estudo

também avaliamos durante 60 dias a cinética de produção de IgM parasito-específica no plasma dos animais infectados com baixa carga parasitária (10L<sub>3</sub>) que receberam ou não o tratamento com dexametasona ou ivermectina (**Figura 22**). Diferentemente da reatividade inicial observada nos animais de alta carga, todos grupos infectados com 10L<sub>3</sub> apresentaram aumento dos níveis de reatividade de IgM anti-L<sub>3</sub> em relação aos níveis basais somente a partir do dia 15 pós infecção, seguido por uma redução gradual até 60dpi, porém sem retornar aos níveis normais (**Figura 22A**). Perfil de reatividade semelhante também foi observado para IgM reativa à antígeno excreto-secretado de L<sub>3</sub> (**Figura 22C**); entretanto, vale salientar que ratos infectados e tratados com dexametasona mostraram aumento significativo de IgM-anti ES/L<sub>3</sub> entre 25-30dpi (**Figura 22C**).

O nível de reatividade de IgM ao antígeno solúvel de verme também foi elevado significativamente somente após 15dpi em todos os grupos infectados com baixa carga (**Figura 22B**). Tanto no grupo dos ratos apenas infectados como dos animais infectados e que receberam tratamento com ivermectina no 15dpi houve pequena redução da reatividade de IgM anti-verme entre 20 e 30dpi, seguido de um aumento a partir do 35dpi que se manteve até o último dia examinado, sem redução do anticorpo após a cura parasitológica dos hospedeiros (**Figura 22B**). Por outro lado, os ratos infectados e imunossuprimidos apresentaram aumento progressivo dos níveis de reatividade de IgM anti-Verme do 20 ao 60dpi (**Figura 22B**). Perfil semelhante de reatividade de IgM também foi verificado para antígenos excreto secretado de verme adulto (**Figura 22D**).





**Figura 22.** Níveis de IgM parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgM reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 10 (baixa carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 10L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \* = p < 0,05 em relação ao dia 0; # = p < 0,05 em relação ao 10L<sub>3</sub>.

### 6.1.7 Reatividade relativa de IgG e dos isotipos IgG1 e IgG2a a diferentes extratos antigênicos de *S. venezuelensis*

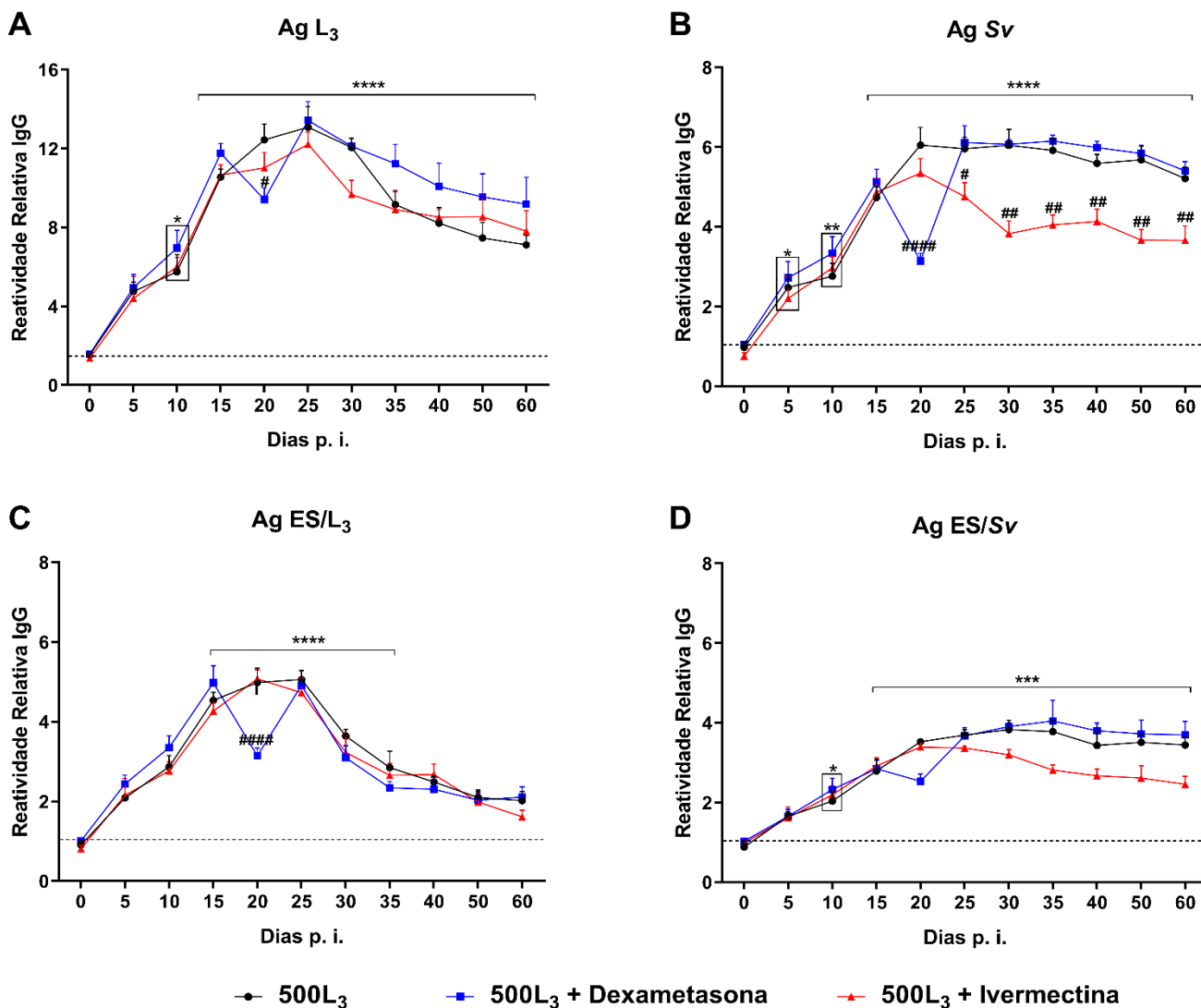
A IgG parasito-específica no plasma dos animais infectados com alta carga e que foram tratados com dexametasona ou ivermectina e avaliados em um período de 60 dias está demonstrada na **Figura 23**.

Em relação ao tempo anterior à infecção, todos os grupos de alta carga parasitária apresentaram elevada reatividade de IgG contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> a partir do dia 10pi (**Figura 23A**). O pico de reatividade de IgG anti-L<sub>3</sub> nesses grupos ocorreu por volta do 25dpi e se manteve com decaimento gradual até o último dia avaliado, porém sem retomar aos níveis normais (**Figura 23A**). No 20dpi, o grupo infectado e tratado com dexametasona, após imunossupressão, demonstrou redução significativa dos níveis de IgG produzidos contra o de L<sub>3</sub> em relação aos demais grupos avaliados (**Figura 23A**). Essa redução nesse grupo imunossuprimido também foi observada na produção de IgG contra os antígenos de Verme e ES/L<sub>3</sub> no 20dpi (**Figura 23B e C**). Vale ressaltar que esses animais, mesmo durante o período de imunossupressão (20 a 25dpi), ainda permaneceram com níveis detectáveis de anticorpo, sugerindo a possibilidade de uso desse teste em indivíduos imunossuprimidos.

Os níveis de reatividade de IgG ao antígeno solúvel de verme em todos os grupos infectados com alta carga, em comparação ao dia 0, aumentou a partir do 5dpi (**Figura 23B**). Nos ratos apenas infectados, essa reatividade aumentou progressivamente até o dia 20pi, e se manteve estável até o último dia avaliado (**Figura 23B**). Os animais infectados e imunossuprimidos apresentaram níveis de IgG anti-Verme semelhante ao grupo somente infectado, com exceção do 20dpi (**Figura 23B**). Por outro lado, os animais que receberam ivermectina demonstraram redução significativa dos níveis de IgG anti-Verme a partir de 20dpi até o último dia examinado, em relação aos demais grupos. No entanto, essa reatividade não retornou aos níveis basais (**Figura 23B**).

Em comparação ao dia 0, a IgG reativa ao antígeno ES/L<sub>3</sub> apresentou aumento de reatividade em todos os grupos de alta carga entre os dias 15 ao 35pi.; entretanto, entre os grupos não houve alterações e diferenças expressivas, exceto pela redução pontual no grupo imunossuprimido no 20dpi (**Figura 23C**). A detecção dos níveis de IgG anti-ES/verme se mostrou semelhante ao evidenciado para antígeno solúvel verme adulto (**Figura 23D**).

## IgG



**Figura 23.** Níveis de IgG parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgG reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \* = p < 0,05 em relação ao dia 0; # = p < 0,05 em relação ao 500L<sub>3</sub>.

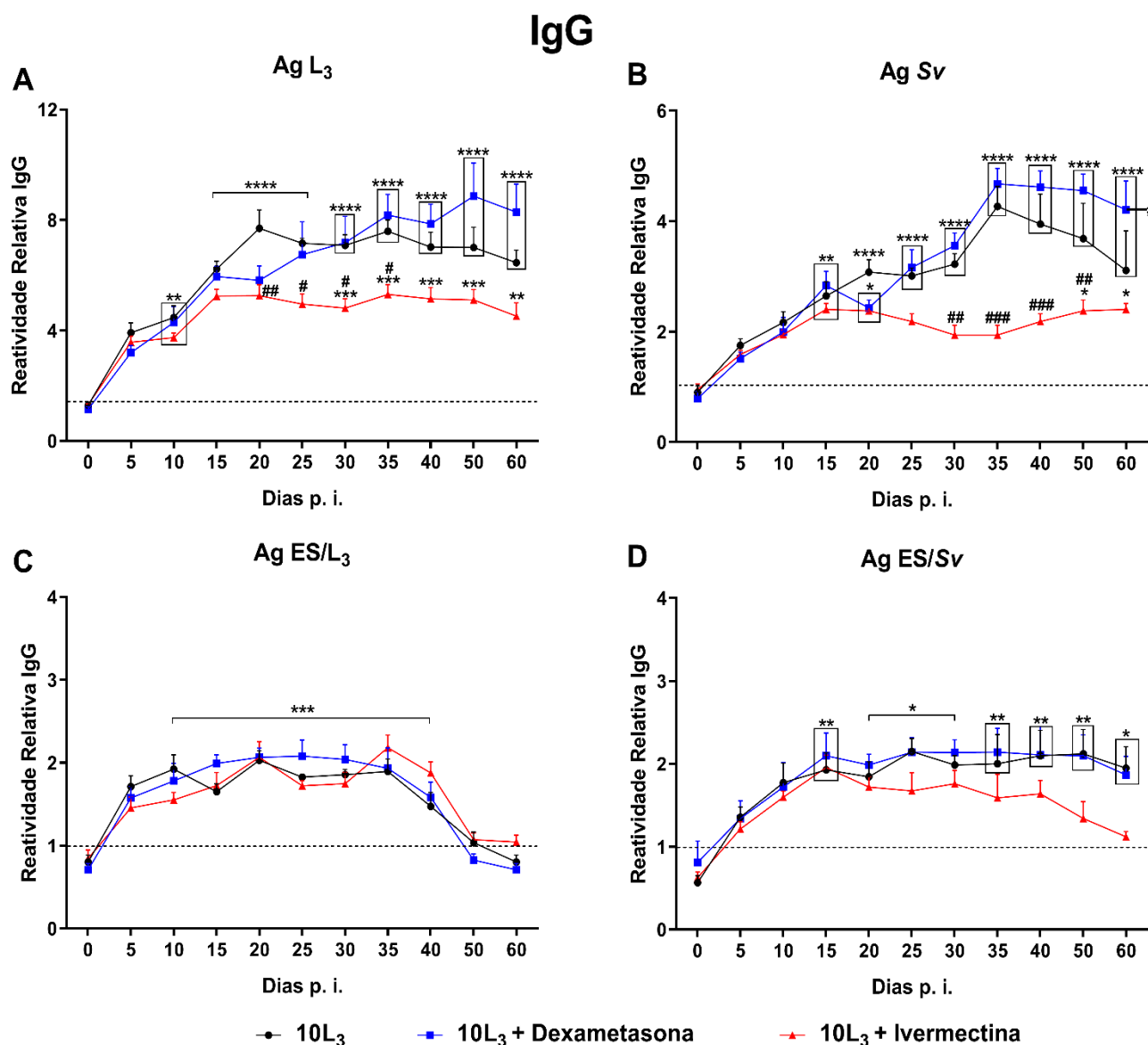
A reatividade de IgG parasito-específica detectada no plasma dos animais infectados com baixa carga parasitária e tratados com dexametasona ou ivermectina e analisados ao longo de 60 dias de experimento está apresentada na **Figura 24**.

Embora com menores níveis de reatividade que os encontrados nos animais infectados com 500L<sub>3</sub>, os grupos de baixa carga também exibiram um aumento de reatividade de IgG contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub> a partir do dia 10pi em relação ao dia 0 (**Figura 24A**). Nos animais apenas infectados, a reatividade IgG anti-L<sub>3</sub> aumentou progressivamente até o 20dpi e seguiu estável até o dia 60pi (**Figura 24A**). Os animais infectados e tratados com dexametasona demonstraram elevação gradual com maiores níveis de reatividade IgG anti-L<sub>3</sub> até o último dia avaliado, quando comparado aos demais grupos, com exceção do dia 20pi, no qual ocorreu uma pequena redução após a imunossupressão (**Figura 24A**). Em contrapartida, o grupo infectado que recebeu ivermectina no 15dpi demonstrou decaimento gradativo dos níveis de IgG anti-L<sub>3</sub> entre 20 a 35dpi, em relação aos outros grupos. A partir do 40dpi, a reatividade desses animais tratados com anti-helmíntico se manteve estável até o último dia avaliado, porém sem retomar aos níveis normais (**Figura 24A**).

A produção de IgG ao antígeno do verme apresentou perfil semelhante ao detectado contra o antígeno solúvel de L<sub>3</sub>, porém com aumento de reatividade somente a partir do dia 15pi, em comparação ao dia 0 (**Figura 24B**).

Apesar dos níveis de IgG contra o antígeno excretado/secretado de L<sub>3</sub> apresentarem-se elevados entre os dias 10 ao 40 pós infecção em todos os grupos de baixa carga em relação ao dia 0, a reatividade nos diferentes grupos não apresentou diferenças e alterações significativas durante os 60 dias avaliados, sugerindo que este antígeno não poderia ser utilizado no teste sorológico desta parasitose (**Figura 24C**).

A IgG reativa ao antígeno ES/Verme nos grupos de baixa carga aumentou a partir do 15dpi em relação ao dia 0 (**Figura 24D**). No grupo somente infectado e no grupo infectado e tratado com dexametasona foi observada uma maior reatividade até o último dia estudado (**Figura 24D**). Os animais infectados e tratados com ivermectina apresentaram uma redução gradual de IgG anti-ES/verme a partir do dia 20pi e, entre 35 a 60dpi, retornaram aos níveis normais, sem diferença estatística ao dia 0 (**Figura 24D**).



**Figura 24.** Níveis de IgG parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgG reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).

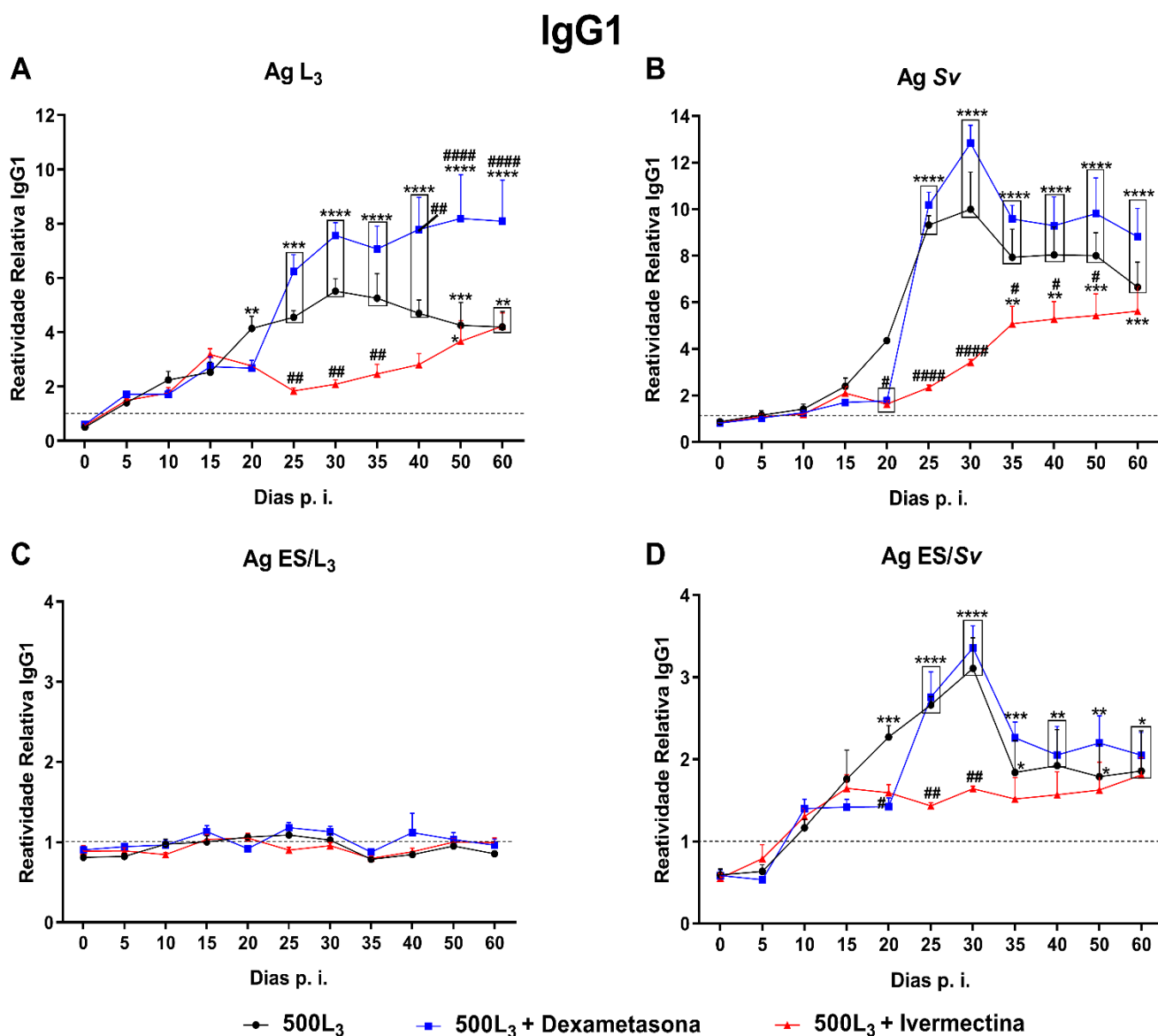
Os ratos foram infectados subcutaneamente com 10 (baixa carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 10L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \* = p < 0,05 em relação ao dia 0; # = p < 0,05 em relação ao 10L<sub>3</sub>.

A **Figura 25** apresenta os níveis de IgG1 presente no plasma dos animais infectados com alta carga parasitária, submetidos ao tratamento com dexametasona ou ivermectina e acompanhados ao longo 60 dias de experimento.

Em relação ao período zero de infecção, a produção de IgG1 reativa contra o antígeno de L<sub>3</sub> ocorreu inicialmente nos animais infectados e sem tratamento a partir de 20dpi, com aumento contínuo até o dia 30pi. Após o dia 35pi, esses animais apenas infectados exibiram uma pequena redução da reatividade IgG1 anti-L<sub>3</sub> até o último dia avaliado, mas sem retornar aos níveis normais (**Figura 25A**). Os animais infectados e imunossuprimidos apresentaram reatividade de IgG1 ao antígeno de L<sub>3</sub> elevada apenas a partir de 25dpi, que seguiu com aumento significativo até o 60dpi, em comparação aos demais grupos (**Figura 25A**). O grupo infectado que recebeu tratamento com ivermectina demonstrou redução da reatividade de IgG1 anti-L<sub>3</sub> a partir de 20dpi, sendo expressivamente menor aos 25, 30 e 35dpi quando comparado aos outros grupos. Em contrapartida, esse grupo tratado com anti-helmíntico exibiu aumento reatividade de IgG1 anti-L<sub>3</sub> nos últimos dias analisados, 50 e 60dpi em relação ao tempo inicial (**Figura 25A**).

O perfil de produção de IgG1 contra antígeno de verme, embora com níveis de reatividade mais elevados, foi similar ao observado para o antígeno de L<sub>3</sub> (**Figura 25B**).

Quanto à detecção da reatividade de IgG1 ao antígeno excretado/secretado de verme, em relação ao dia 0, o grupo infectado sem tratamento apresentou aumento inicial no 20dpi; enquanto o grupo infectado e tratado com dexametasona demonstrou elevação no 25dpi. No entanto, ambos tiveram elevação constante até atingir o pico no dia 30pi, seguido de uma redução dos níveis de IgG1 anti-ES/Verme a partir de 35dpi e que se manteve estável até o último dia examinado (**Figura 25D**). Os animais que receberam ivermectina, após tratamento no 15dpi não demonstraram aumento dos níveis IgG1 anti-ES/Verme ao longo dos dias avaliados, com exceção apenas do dia 60pi, onde tiveram aumento estatístico da reatividade, em comparação ao tempo zero de infecção (**Figura 25D**).



**Figura 25. Níveis de IgG1 parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgG1 reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme (D).**

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*= $p < 0,05$  em relação ao dia 0; #= $p < 0,05$  em relação ao 500L<sub>3</sub>.

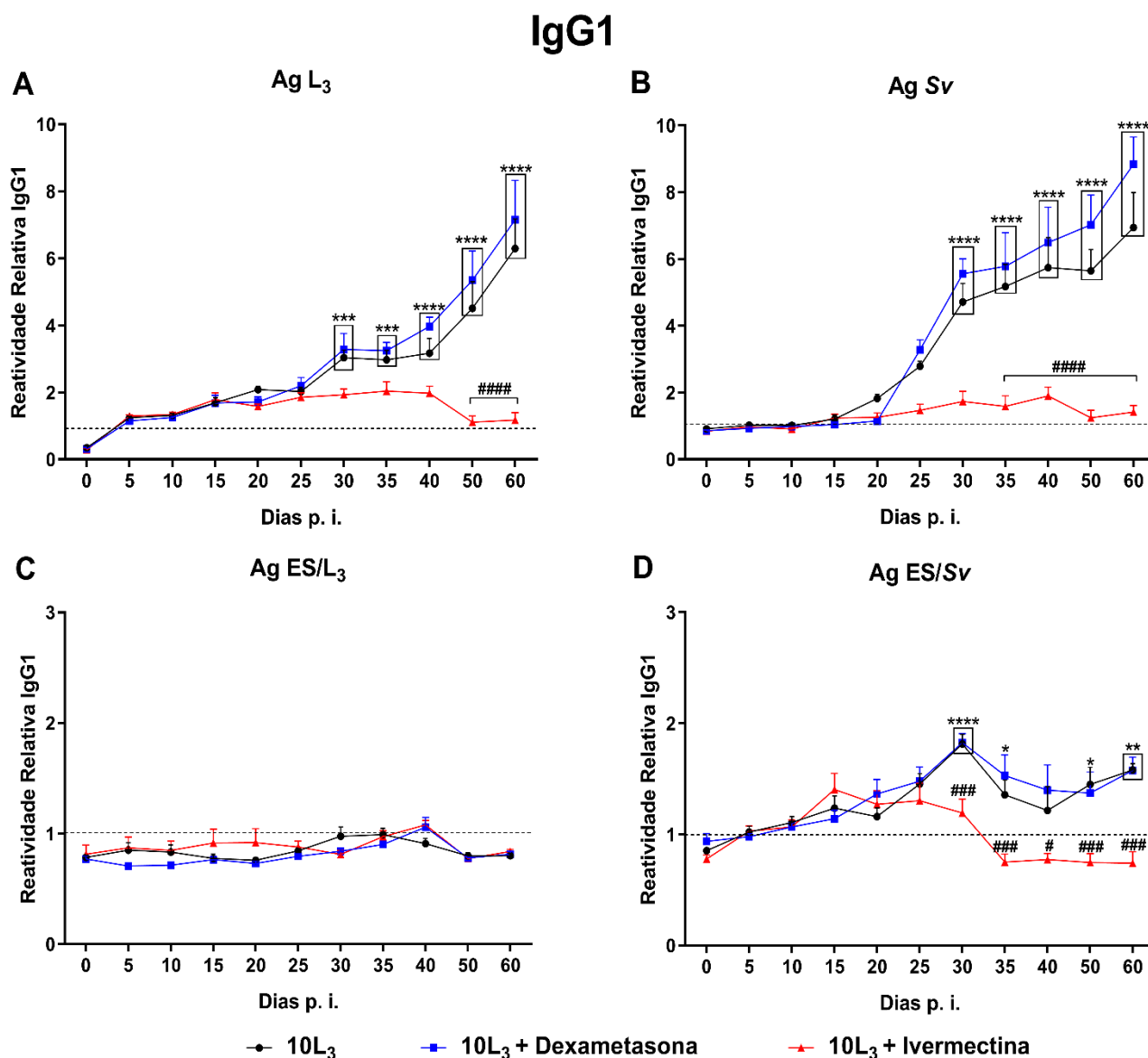
A presença da subclasse IgG1 no plasma dos animais infectados com baixa carga parasitária, tratados com dexametasona ou ivermectina e examinados no período de 60 dias está apresentada na **Figura 26**.

Em contraste aos níveis de reatividade detectados nos animais de alta carga, a produção de IgG1 contra os antígenos de L<sub>3</sub> e verme nos grupos infectados com 10L<sub>3</sub> (baixa carga) foi detectada mais tardiamente, com início somente no dia 30 pós infecção em relação ao dia 0 (**Figura 26A e B**). Tanto o grupo apenas infectado quanto o grupo infectado e tratado com dexametasona demonstraram aumento progressivo da reatividade de IgG1 anti-L<sub>3</sub> e anti-Verme entre os dias 30 ao 60pi (**Figura 26A e B**). No entanto, os animais infectados que receberam ivermectina no 15dpi tiveram redução gradual dos níveis de IgG1 anti-L<sub>3</sub> e anti-Verme a partir do 25dpi até o último dia analisado, sendo significativamente menor que nos demais grupos (**Figura 26A e B**).

A produção de IgG1 reativa ao antígeno excretado/secretado de verme nos animais apenas infectados e no grupo infectado e imunossuprimido também foi elevada somente a partir do dia 30pi (**Figura 26D**). Ambos os grupos apresentaram uma pequena redução da reatividade IgG1 anti-ES/Verme aos 35 e 40dpi; entretanto, nos últimos dias (50 e 60dpi) examinados seguiu com aumento gradual (**Figura 26D**). Por outro lado, no grupo infectado e tratado com ivermectina, houve decaimento da reatividade IgG1 anti-ES/Verme após o 25dpi, que seguiu reduzindo de forma significativa até o último dia avaliado (**Figura 26D**).

Os níveis de reatividade de IgG1 ao antígeno excreto/secretado de L<sub>3</sub> foi baixa no plasma tanto dos animais infectados com alta carga como nos de baixa carga durante todo período de examinado, sugerindo que este antígeno não teria relevância no diagnóstico da estrogiloidíase (**Figura 25C e 26C**).





**Figura 26. Níveis de IgG1 parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgG1 reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).**

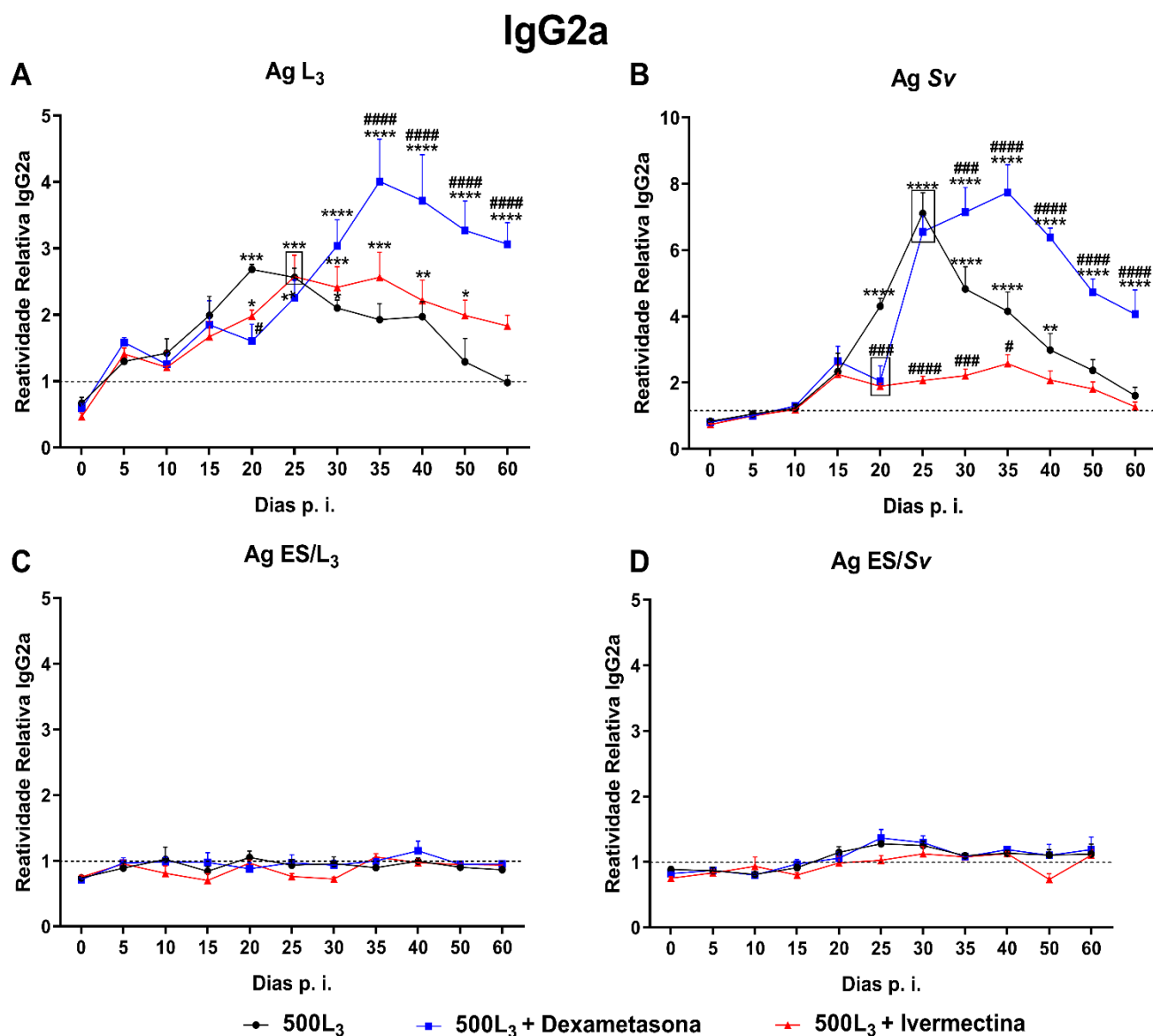
Os ratos foram infectados subcutaneamente com 10 (baixa carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 10L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \* = p < 0,05 em relação ao dia 0; # = p < 0,05 em relação ao 10L<sub>3</sub>.

Na **Figura 27** estão demonstrados os níveis de reatividade da subclasse IgG2a presente no plasma dos animais infectados com alta carga, que receberam dexametasona ou ivermectina e analisados ao longo 60 dias.

A reatividade de IgG2a ao antígeno de L<sub>3</sub>, em comparação ao tempo zero, mostrou aumento inicial no 20dpi nos animais apenas infectados que, após pico de reatividade, apresentou redução progressiva até o último dia avaliado (**Figura 27A**). Nesse grupo somente infectado, entre 35 ao 60dpi, os níveis de reatividade IgG2a anti-L<sub>3</sub> retornaram aos níveis basais, corroborando com a cura parasitológica nesses animais (**Figura 27A**). Nos ratos infectados e submetidos a imunossupressão, embora apresentando redução dos níveis de IgG2a anti-L<sub>3</sub> no 20dpi, a partir do dia 25pi houve aumento significativo e gradual até 35dpi; e após, mesmo esse grupo imunossuprimido tendo leve redução até o último dia analisado, os níveis de IgG2a anti-L<sub>3</sub> aos 35, 40, 50 e 60dpi, foram mais elevados em comparação aos demais grupos (**Figura 27A**). O grupo infectado e tratado com ivermectina também exibiu elevada reatividade de IgG2a anti-L<sub>3</sub> a partir do 20dpi, seguindo com aumento até 25dpi; no entanto, entre 35 ao 60dpi, esse grupo tratado com anti-helmíntico teve decaimento gradativo, sendo o último dia (60dpi) estatisticamente semelhante ao dia 0 (**Figura 27A**).

Os níveis de IgG2a contra o antígeno de verme demonstrou perfil de reatividade semelhante ao evidenciado para o antígeno de L<sub>3</sub> (**Figura 27B**). A produção de IgG2a anti-Verme no grupo somente infectado e no grupo infectado e tratado com ivermectina também retomou aos níveis basais nos últimos dias avaliados (**Figura 27B**). No grupo infectado e imunossuprimido ocorreu aumento contínuo da produção de IgG2a anti-verme que, embora com leve redução nos últimos dias, não retornou aos níveis basais (**Figura 27B**).

A produção de IgG2a reativa aos antígenos excreto/secretado de L<sub>3</sub> e de Verme adulto permaneceram baixos e inalterados durante todo período de analisado, tanto nos grupos infectados com alta carga como nos de baixa carga parasitária (**Figura 27C e D; 28C e D**).



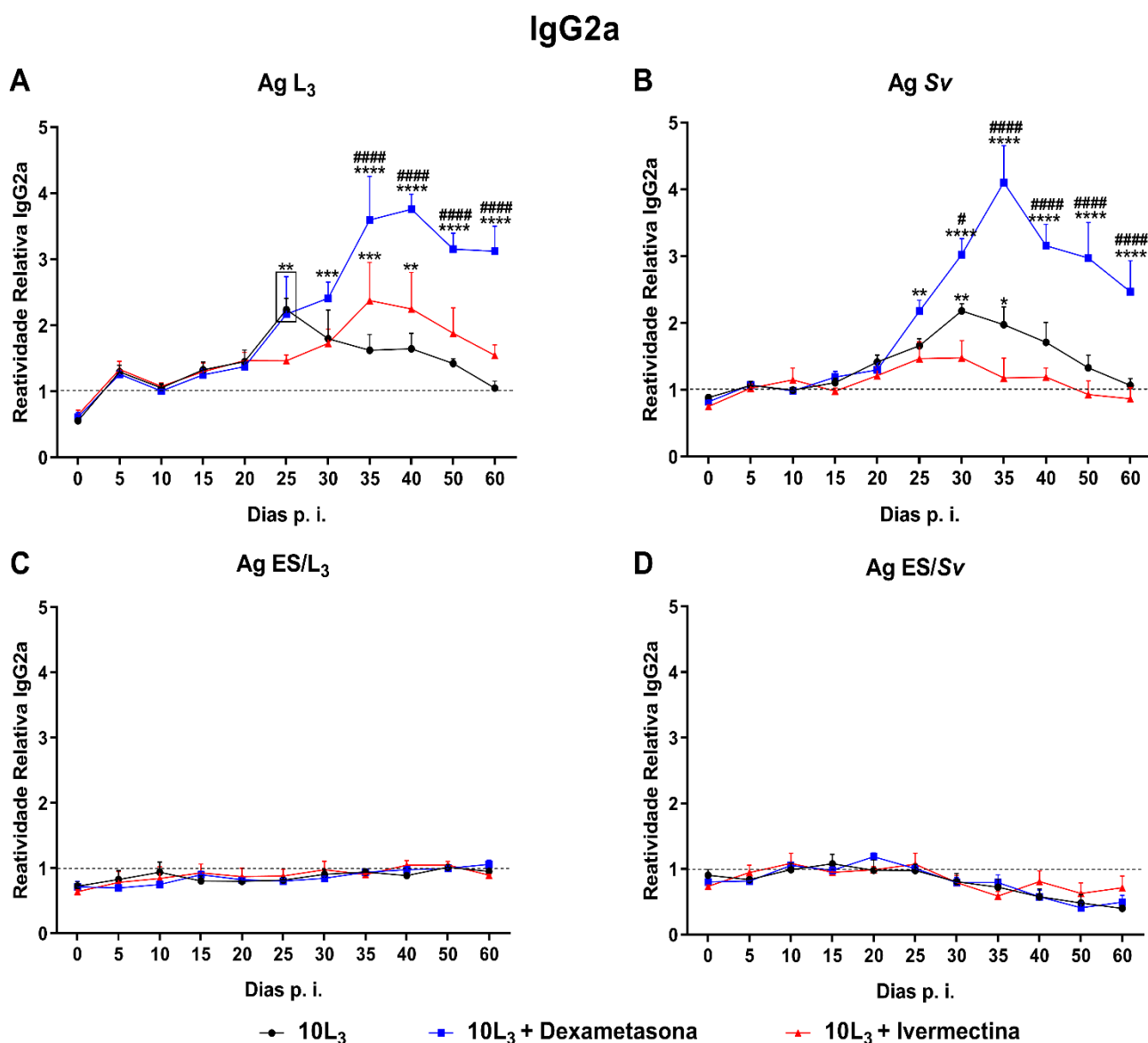
**Figura 27. Níveis de IgG2a parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgG2a reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).**

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*= $p < 0,05$  em relação ao dia 0; #= $p < 0,05$  em relação ao 500L<sub>3</sub>.

Os níveis de IgG2a detectados no plasma dos animais infectados com baixa carga e tratados ou não com dexametasona ou ivermectina, acompanhados por um período de 60 dias, apresentaram reatividade apenas contra os antígenos solúveis de L<sub>3</sub> e de verme adulto (**Figura 28**).

A reatividade de IgG2a contra antígeno de L<sub>3</sub> (**Figura 28A**) no grupo apenas infectado e no infectado e tratado com dexametasona aumentou a partir do 25dpi. Essa reatividade se manteve alta significativamente até o último dia avaliado apenas no grupo imunossuprimido (**Figura 28A**). O grupo somente infectado apresentou redução dos níveis de IgG2a anti-L<sub>3</sub> a partir do 30dpi até o último dia examinado, com retorno aos níveis basais (**Figura 28A**). No grupo infectado e tratado com Ivermectina houve aumento da reatividade de IgG2a anti-L<sub>3</sub> apenas nos dias 35 e 40 pós infecção; seguido de redução a níveis normais até o 60dpi (**Figura 28A**). Esse perfil de reatividade de IgG2a anti-L<sub>3</sub>, foi semelhante ao evidenciado para o antígeno de verme (**Figura 28B**).

O teste de reatividade de IgG2a utilizando antígenos solúveis de L<sub>3</sub> e Verme, nos animais de alta e de baixa carga, foi capaz de detectar níveis de infecção ativa e/ou de animais infectados que foram curados. Com isso, dando indícios que esse teste teria grande importância para uso no diagnóstico da estrogiloidíase.

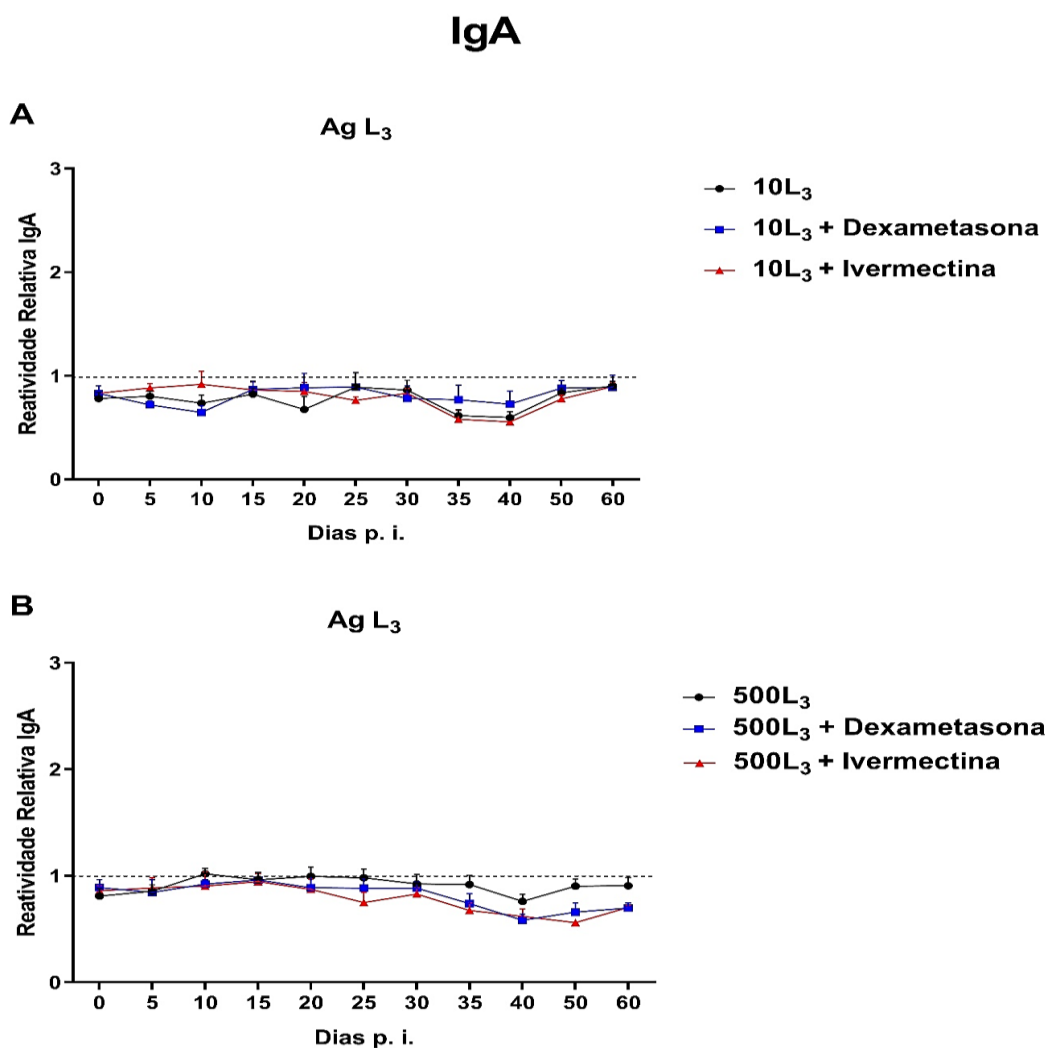


**Figura 28. Níveis de IgG2a parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgG2a reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme (D).**

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 10 (baixa carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 10L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \* = p < 0,05 em relação ao dia 0; # = p < 0,05 em relação ao 10L<sub>3</sub>.

### 6.1.8 Reatividade relativa de IgA a diferentes extratos antigênicos de *S. venezuelensis*

Os níveis de reatividade de IgA ao antígeno de L<sub>3</sub> no plasma tanto nos grupos infectados com baixa carga (**Figura 29A**) quanto dos infectados com alta carga (**Figura 29B**), permaneceram inalterados ao longo dos 60 dias avaliados.



**Figura 29. Níveis de IgA parasito-específica no plasma de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgA reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> em de grupos infectados com baixa carga (A) e com alta carga (B).**

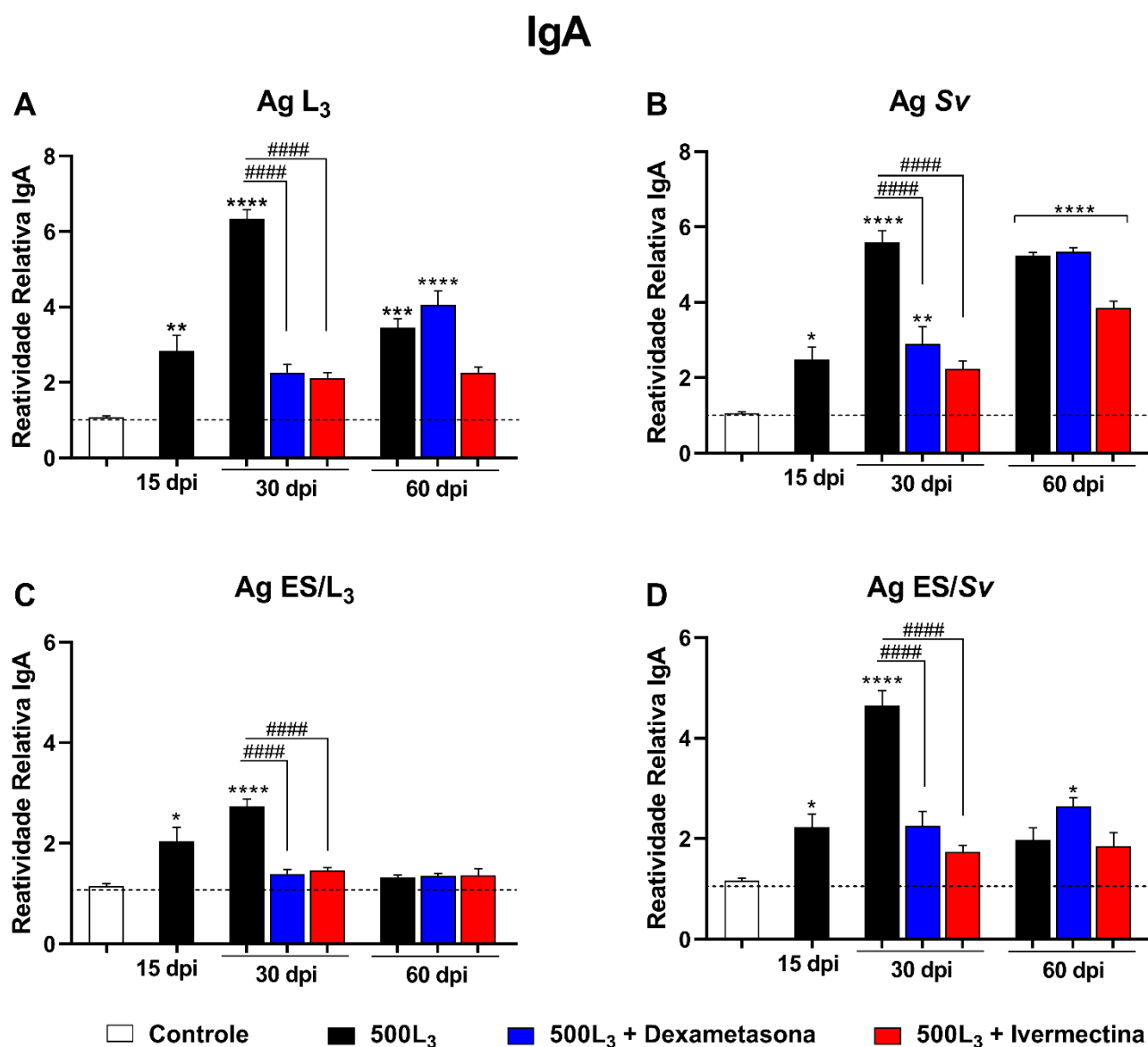
Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. Aos 0 (antes da infecção), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 dias após infecção, foram feitas coletas de sangue das veias laterais da cauda, para avaliação e obtenção do plasma para realização dos ensaios imunoenzimáticos. Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> ou 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo.

Como não se observou a reatividade de IgA no plasma dos grupos de baixa e alta carga, testamos a produção desse anticorpo contra diferentes antígenos de *S. venezuelensis* no lavado intestinal desses animais em três diferentes pontos de análise (**Figura 30 e 31**).

Quanto aos grupos de alta carga, a detecção de IgA se mostrou reativa a todos os antígenos testados (**Figura 30**), sendo significativamente elevada aos 15 e 30dpi no grupo somente infectado em relação ao controle. Os níveis de reatividade nesses animais de alta carga e sem tratamento no 30dpi também foram expressivamente elevados, quando comparado aos grupos infectados e tratados com dexametasona ou ivermectina (**Figura 30**). No último ponto avaliado, em comparação ao controle, esse grupo apenas infectado manteve um aumento estável de IgA anti-Verme, mas exibiu uma redução de IgA anti-L3 (**Figura 30A e B**).

Os animais infectados e tratados com dexametasona demonstram aumento dos níveis de IgA aos antígenos de L3, verme e ES/verme no último ponto avaliado, em relação ao controle (**Figura 30A, B e D**). Esse grupo imunossuprimido, no 30dpi, também apresentou aumento dos níveis IgA apenas contra antígeno de verme, quando comparado ao controle (**Figura 30B**).

O grupo infectado que recebeu ivermectina no 15dpi exibiu aumento da reatividade de IgA apenas contra o antígeno de verme no 60dpi, em relação ao controle (**Figura 30B**). Em contrapartida, nos demais pontos examinados após tratamento com anti-helmíntico, esse grupo demonstrou baixos níveis de reatividade IgA parasito-específica no lavado intestinal, sendo estatisticamente semelhante ao controle (**Figura 30**).



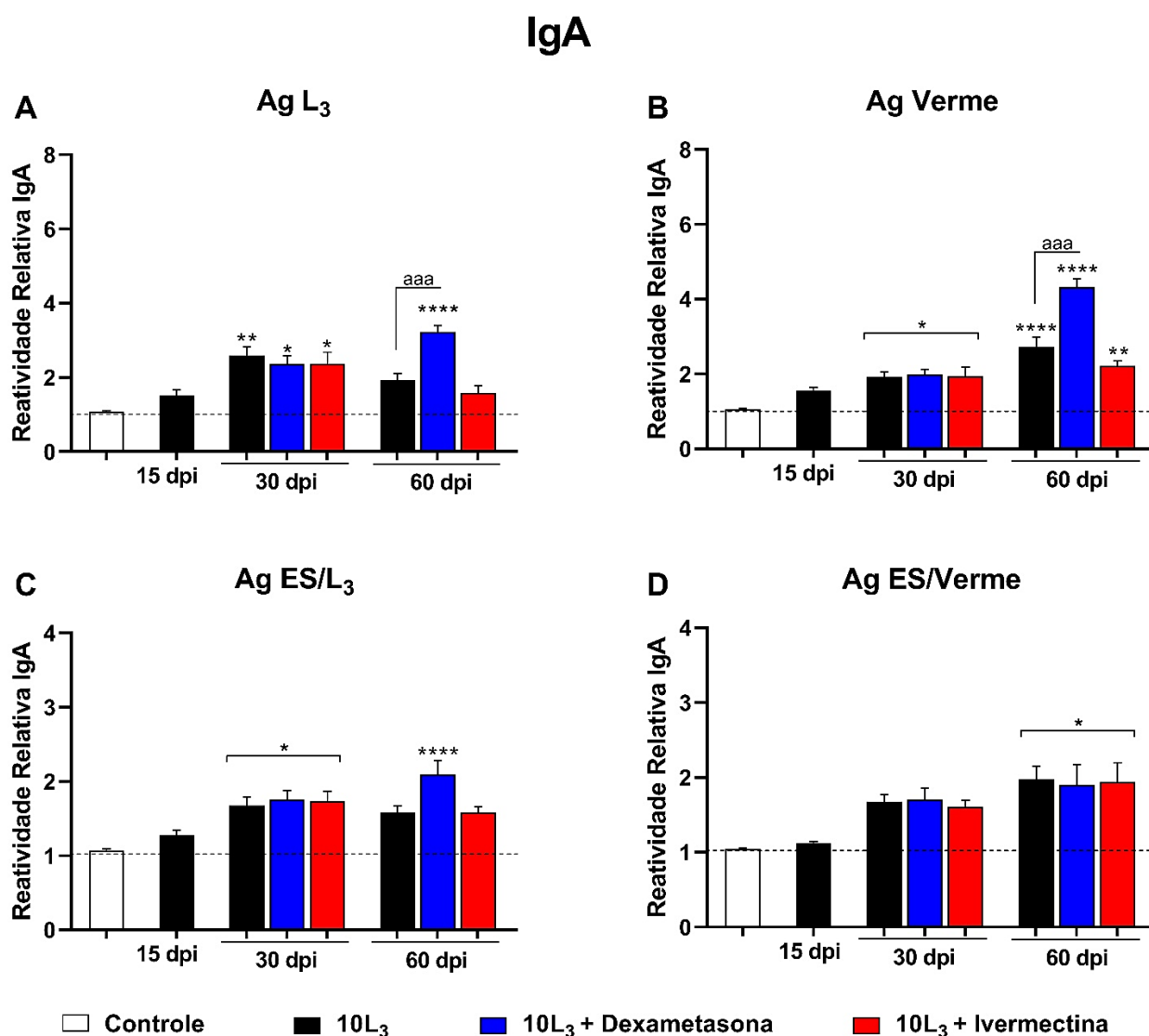
**Figura 30. Níveis de IgA parasito-específica no lavado intestinal de ratos Wistar durante a infecção com 500L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina. IgA reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).**

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 500 (alta carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. O lavado intestinal foi obtido aos 15, 30, e 60 dias após infecção com a aplicação de 3mL de PBS estéril contendo coquetel inibidor de protease na metade proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal) dos animais experimentais. O material recolhido foi centrifugado e o sobrenadante utilizado no ensaio de ELISA para avaliar a presença de IgA. Grupo 500L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 500L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15pi em dose de 4mg/Kg/dia por via IP durante 3 dias; Grupo 500L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*=p<0,05 em relação ao dia 0; #=p<0,05 em relação ao 500L<sub>3</sub>.



Diferentemente dos animais infectados com alta carga parasitária que mostraram aumento de IgA parasito-específico no lavado intestinal já aos 15dpi (**Figura 30**), os ratos infectados com baixa carga parasitária a elevação dos níveis de IgA parasito-específica ocorreu somente a partir do dia 30 pós infecção contra os antígenos de L<sub>3</sub>, Verme e ES/L<sub>3</sub> (**Figura 31A, B e C**). Esse aumento da reatividade de IgA se manteve em todos os grupos de baixa carga até o dia 60pi somente contra os antígenos de verme e ES/verme, em comparação ao controle (**Figura 31B e D**). Em contrapartida, a reatividade de IgA contra o antígeno de L<sub>3</sub> nesse último ponto avaliado reduziu significativamente no grupo apenas infectado e no infectado e tratado (**Figura 31A**). Em ambos os grupos, após cura parasitológica, o teste de IgA anti-L<sub>3</sub> detectou níveis sem diferença ao grupo controle.

O grupo infectado que recebeu dexametasona apresentou aumento expressivo dos níveis de IgA reativa contra todos os antígenos testados no 60dpi, quando comparado ao controle (**Figura 31**). A produção de IgA anti-L<sub>3</sub> e anti-verme nesse grupo imunossuprimido no último dia analisado foi significativamente maior em relação ao grupo apenas infectado (**Figura 31A e B**).



**Figura 31. Níveis de IgA parasito-específica no lavado intestinal de ratos Wistar durante a infecção com 10L<sub>3</sub> de *Strongyloides venezuelensis* e após tratamento com dexametasona ou ivermectina.** IgA reativa ao antígeno de L<sub>3</sub> (A), de verme adulto (B), excretado-secretado (E/S) de L<sub>3</sub> (C) e ES de verme adulto (D).

Os ratos foram infectados subcutaneamente com 10 (baixa carga) larvas infectantes de *S. venezuelensis* no dia 0. O lavado intestinal foi obtido aos 15, 30, e 60 dias após infecção com a aplicação de 3mL de PBS estéril contendo coquetel inibidor de protease na metade proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal) dos animais experimentais. O material recolhido foi centrifugado e o sobrenadante utilizado no ensaio de ELISA para avaliar a presença de IgA. Grupo 10L<sub>3</sub>= animais apenas infectados; Grupo 10L<sub>3</sub> + Dexametasona= animais infectados e tratados com imunossupressor no dia 15 pi. por via IP durante 3 dias; Grupo 10L<sub>3</sub> + Ivermectina= animais infectados e tratados com anti-helmíntico no dia 15pi em dose de 200µg/kg/dia por via oral durante 2 dias. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM), e foram analisados por Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. n= 7 ratos/grupo. \*= $p < 0,05$  em relação ao dia 0; #= $p < 0,05$  em relação ao 10L<sub>3</sub>.

## 6.2 População humana

### 6.2.1 Caracterização e perfil parasitológico da população em estudo

Na população de Vergel do Lago, cidade de Maceió, 68 pessoas residentes fixos aceitaram participar do estudo, concordando e atendendo a todos os critérios de inclusão, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE e fornecendo as amostras biológicas necessárias para as avaliações. Desse quantitativo, 49 pessoas eram do sexo feminino (72,1%) e 19 (27,9%), do sexo masculino. A idade dentro dessa população amostral variou entre 9 a 84 anos, obtendo-se uma mediana de 47,5 e intervalo interquartis de 34 e 59 anos (**Tabela 6**).

Utilizando os resultados da combinação de todos os métodos de diagnóstico parasitológicos aplicados, incluindo Rugai-modificado, Cultura em placa de ágar, Sedimentação espontânea e Helmintex, 6 dos 68 indivíduos avaliados apresentaram larvas de *S. stercoralis* nas fezes, prevalência estimada de 8,8%. As análises parasitológicas também detectaram 16 (23,5%) indivíduos infectados por *S. mansoni*, 6 (8,8%) infectados por *Ascaris* sp., um (1,5%) caso de ancilostomíase e um (1,5%) indivíduo infectado por *Taenia* sp. O exame parasitológico também revelou infecção intestinal por protozoários na população estudada, onde: 23 indivíduos (33,8%) apresentaram cistos de *Giardia lamblia* nas fezes, 6 (8,8%) de *Entamoeba histolytica/díspar*, e 10 (14,7%) apresentaram cistos de *E. coli*. Entre os 6 indivíduos infectados por *S. stercoralis*, 3 estavam coinfectados com outros parasitas: um indivíduo apresentou ovos de *S. mansoni* e *Ascaris* sp; um apresentou apenas ovos de *S. mansoni*; e outro apresentou cistos de *Giardia lamblia*. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na prevalência da infecção por *S. stercoralis* entre sexo ou faixa etária da população estudada (**Tabela 6**).

**Tabela 6. Caracterização demográfica e perfil parasitológico dos moradores da comunidade de Vergel do Lago, município de Maceió, Alagoas, Brasil.**

Variáveis	Categoria	Total			
		N	%		
Sexo (n=68)	Masculino	19	27.9		
	Feminino	49	72.1		
Infecção parasitária (n=68)				<b>Monoinfectado</b>	<b>Coinfectado</b>
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	6	8.8	3	3
	<i>Schistosoma mansoni</i>	16	23.5	5	11
	Ancilostomídeos	1	1.5	0	1
	<i>Ascaris</i> sp.	6	8.8	1	5
	<i>Taenia</i> sp.	1	1.5	0	1
	<i>Entamoeba histolytica/díspar</i>	6	8.8	0	6
	<i>Giardia lamblia</i>	23	33.8	6	17
	<i>Entamoeba coli</i>	10	14.7	1	9
	Negative	30	44.1	-	-
Infecção por sexo	Masculino (n=19)	2	10.5		<b>p-valor<sup>a</sup></b> 0.75
	Feminino (n=49)	4	8.2		
Infecção por idade	9-20 (n=3)	1	33.3		<b>p-valor<sup>a</sup></b> 0.28
	21-40 (n=22)	3	13.7		
	41-60 (n=28)	1	3.5		
	>60 (n=15)	1	6.7		

<sup>a</sup> p-valor calculado pelo teste Qui-quadrado.

### 6.2.2 Desempenho da técnica de Rugai-modificado (RMOD) no diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em indivíduos infectados na população em estudo

Conforme determinado pelo Padrão de Referência Consolidado (CRS), que estimou a prevalência global da infecção por *S. stercoralis* na população estudada a partir do cálculo do número de indivíduos positivos encontrados em pelo menos um dos testes diagnósticos realizados, a prevalência total da infecção por *S. stercoralis* na população de Vergel do Lago, Maceió foi de 8,82% (6/68). As técnicas de Cultura em placa de ágar e sedimentação espontânea apresentaram sensibilidade de 50% (3 dos 6 indivíduos infectados) e 33,3% (2 dos 6 indivíduos infectados), respectivamente.

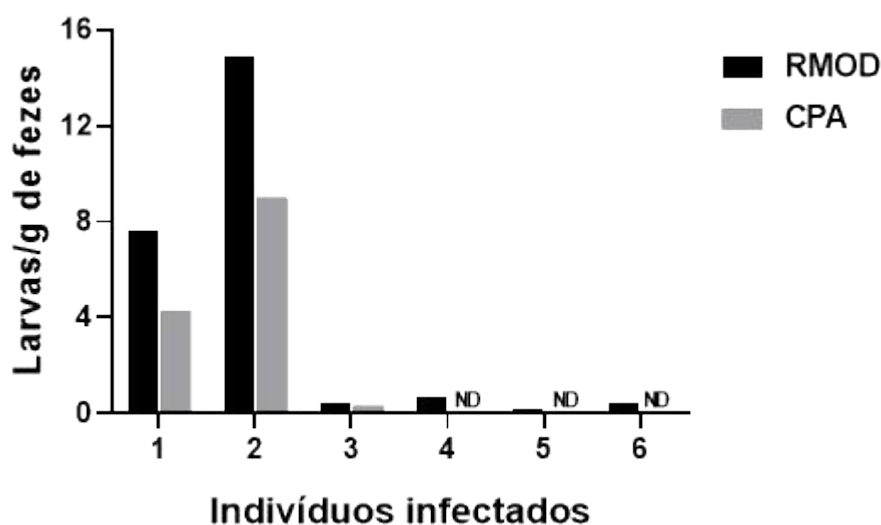
Contudo, a técnica de Rugai-modificado detectou todos os indivíduos infectados, demonstrando assim 100% de sensibilidade. Com base na análise de concordância (Kappa), foi possível constatar que a utilização da técnica de Rugai-modificado nesta população resultou em um índice Kappa igual a 1,0, ou seja, todos os indivíduos infectados foram identificados pela técnica, enquanto que o índice Kappa para técnica de Cultura em placa de ágar foi 0,64 e para Sedimentação espontânea foi de 0,48 (Tabela 7).

**Tabela 7. Desempenho diagnóstico das técnicas parasitológicas de Rugai-modificado (RMOD), Cultura em placa de ágar (CPA) e Sedimentação espontânea (SS) comparada ao Padrão de Referência Consolidado (CRS) para detecção da estrogiloidíase em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil.**

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Kappa (95% IC)
<b>RMOD</b>	100	100	100	100	1 (0.76 - 1.2)
<b>CPA</b>	50	100	100	95.3	0.64 (0.42 - 0.87)
<b>SS</b>	33.3	100	100	93.9	0.48 (0.28 - 0.68)

RMOD= Rugai-modificado; CPA= Cultura em placa de ágar; SS= Sedimentação espontânea; VPP= Valor preditivo positivo; VPN= Valor preditivo negativo; IC= Intervalo de confiança.

Além do mais, confirmando os dados encontrados no modelo experimental, nosso estudo realizado na população humana evidenciou que a técnica de Rugai-modificado também foi capaz de recuperar maior número de larvas nos indivíduos encontrados infectados por *S. stercoralis*. Conforme ilustrado na **Figura 32**, a técnica de Cultura em placa de ágar obteve menor recuperação de larvas nos três indivíduos infectados detectados por esta técnica, enquanto que os outros 3 indivíduos infectados com carga parasitária muito baixa na técnica de Rugai-modificado não foram diagnosticados pela técnica de Cultura em placa de Agar.



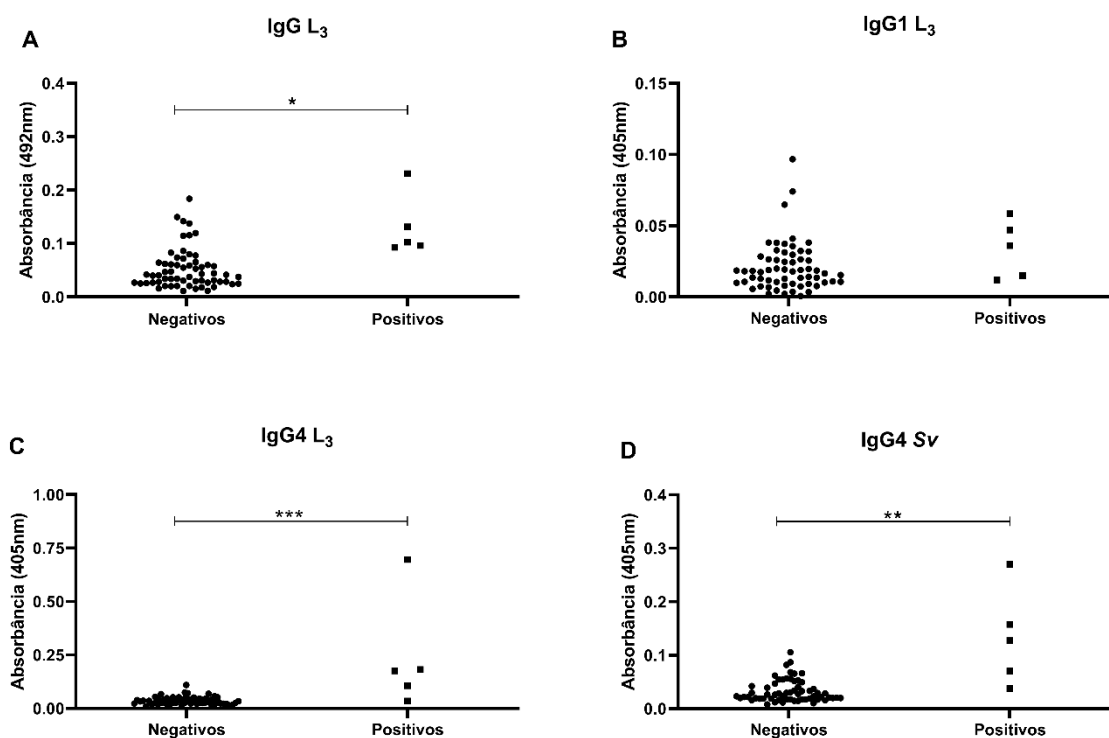
**Figura 32.** Contagem de larvas detectadas pelas técnicas de Rugai-modificado (RMOD) e Cultura em placa de ágar (CPA) em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil, infectados por *Strongyloides stercoralis*.

Dos seis indivíduos infectados detectados, foram utilizados dez gramas de fezes para RMOD ou três gramas para CPA. O número de larvas encontrado na análise de todo o sedimento foi utilizado para calcular o número médio estimado de larvas por grama de fezes. ND= não detectado.

### 6.2.3 Reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 frente a diferentes extratos antigênicos de *Strongyloides venezuelensis*

A **Figura 33** demonstra a reatividade de IgG e das subclasses IgG1 e IgG4 testada em amostras de soro da população estudada contra os antígenos de *S. venezuelensis*, extrato total de L<sub>3</sub> e de verme adulto, que tiveram melhor desempenho nos testes em modelo experimental. O Padrão de Referência Consolidado definiu 6 indivíduos como infectados (Positivos) por *S. stercoralis* e 61 indivíduos como não infectados por este helminto (Negativos), independente de outras parasitoses. No entanto, em relação aos indivíduos definidos como infectados, um se recusou a fornecer amostra de sangue para as análises sorológicas, com isso utilizou-se soro apenas de 5 dos 6 indivíduos que estavam eliminando larvas nas fezes. O nível de reatividade de IgG ao antígeno solúvel de L<sub>3</sub> em amostras soro de indivíduos onde foi constata a presença de larvas do parasito nas fezes foi estatisticamente maior em comparação a reatividade detectada em amostras soro de indivíduos sem a presença de larvas (**Figura 33A**). A reatividade de IgG4 aos antígenos de L<sub>3</sub> e verme adulto (Sv) também foi significativamente maior em indivíduos que liberaram larvas de *S.*

*stercoralis* nas fezes em comparação com indivíduos com exames parasitológicos negativos para essa infecção (**Figura 33C e D**). O nível de reatividade sérica de IgG1 nos indivíduos testados foi muito baixa e não apresentou diferenças significativas (**Figura 33B**).



**Figura 33.** Níveis de reatividade dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG4 contra antígenos solúveis de L<sub>3</sub> ou verme adulto de *Strongyloides venezuelensis* em soros de moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil.

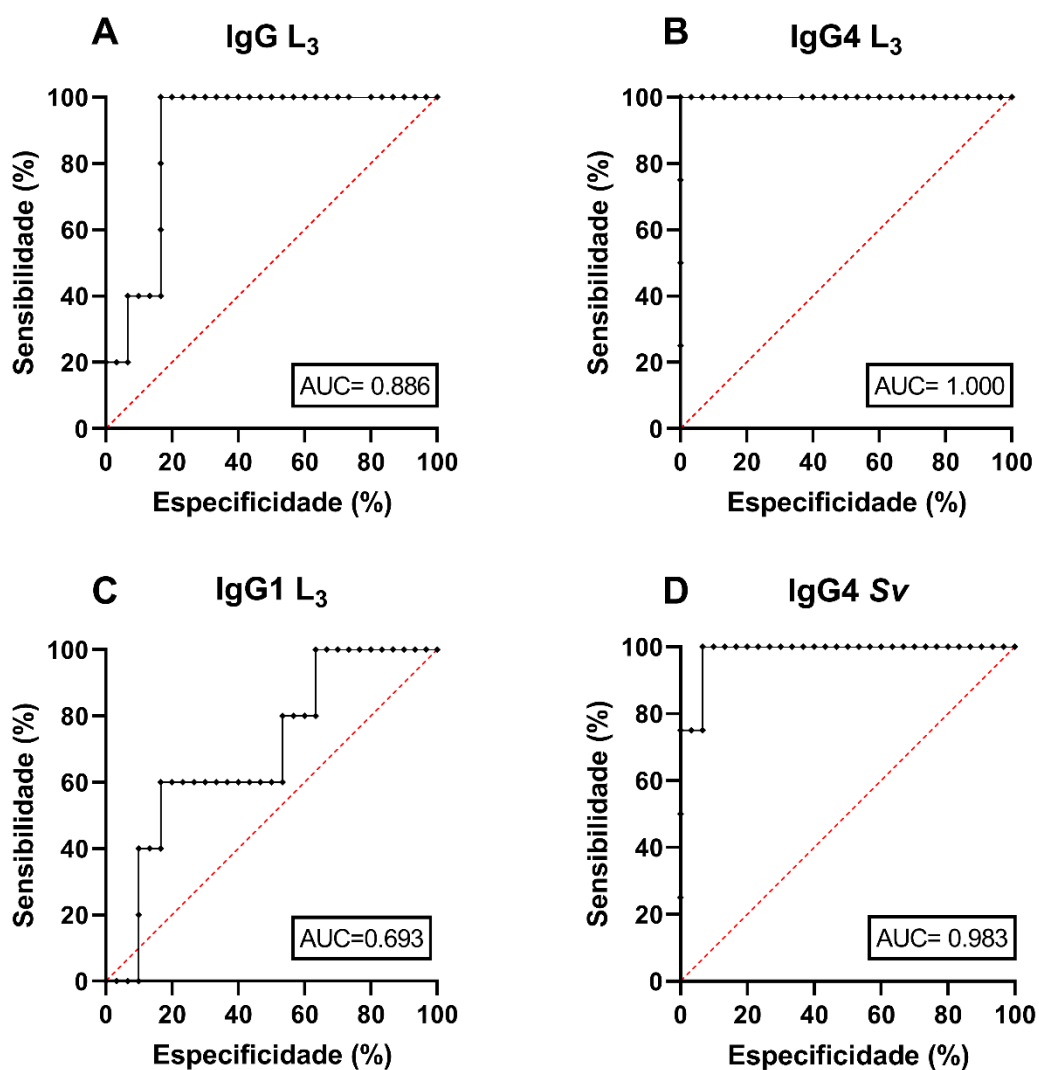
Amostras de soros de indivíduos identificados por diferentes métodos parasitológicos (CRS) como infectados (Positivos para *S. stercoralis*) ou não infectados (Negativos) foram utilizadas para o ensaio de ELISA. As absorbâncias obtidas foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney, e as diferenças significativas entre os grupos foram indicadas para cada ensaio (\* $p \leq 0,01$ ; \*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$  indica diferença estatística entre os grupos).

#### 6.2.4 Determinação dos valores de corte para diferentes reatividades de imunoglobulinas e extratos antigênicos

O valor de corte de reatividade para cada imunoglobulina e antígeno testado foi determinado a partir da curva ROC e as análises TG-ROC, conforme ilustrado nas **Figuras 34 e 35**. Na **Tabela 8** encontra-se o valor de absorbância utilizado para definir positividade do teste (valor de corte), além dos valores de área sob a curva (AUC)

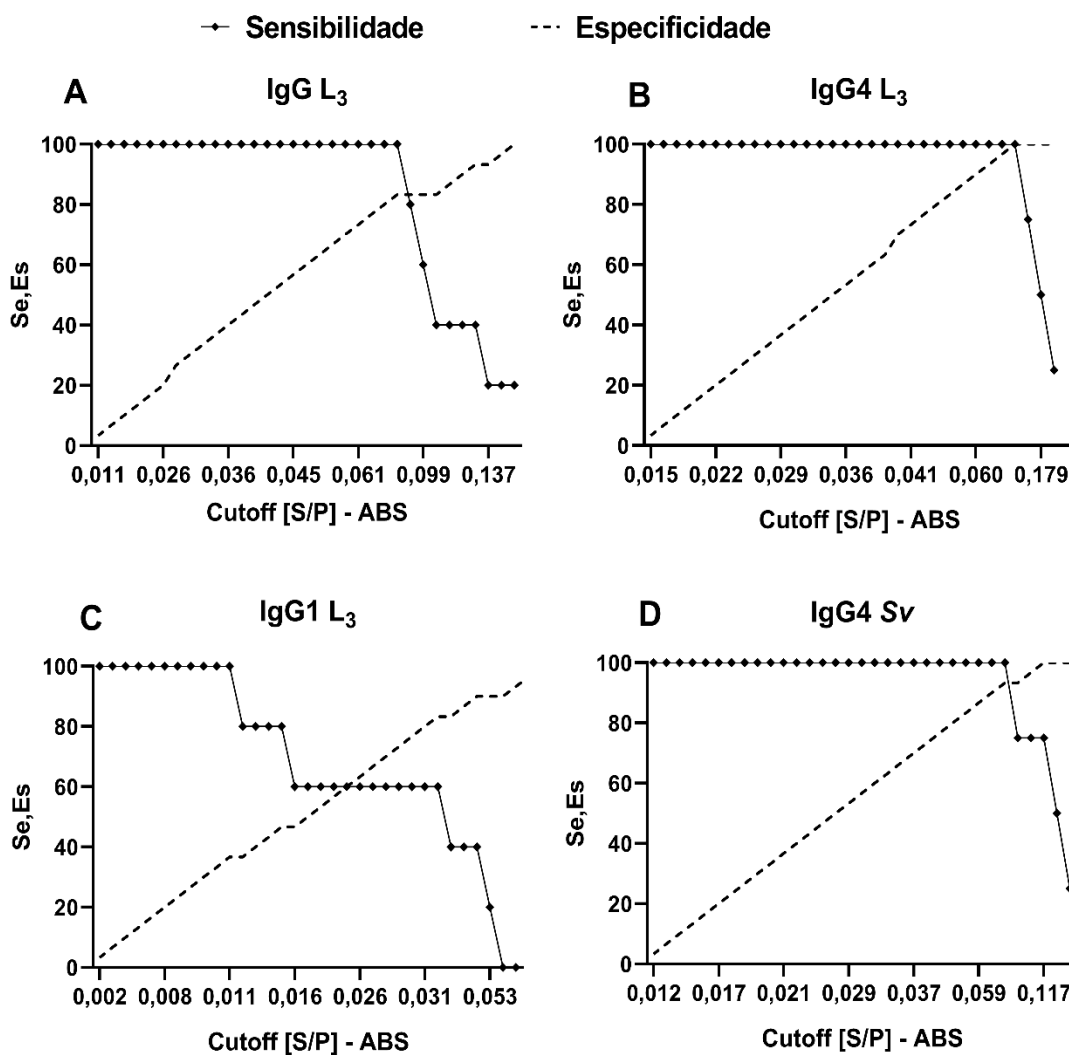
definido pela curva ROC, sensibilidade e especificidade para cada antígeno avaliado e isotipo de anticorpo testado, utilizando soros de indivíduos selecionados como verdadeiramente infectados (n=5) e não infectados (n=30) da área de estudo, que além de não apresentar larva de *Strongyloides* nas fezes, também não tinham outros parasitos intestinais no exames coprológicos realizados. A reatividade sérica de IgG1 ao antígeno solúvel de L<sub>3</sub> demonstrou baixo poder de discriminação entre verdadeiramente infectados e controle, com valor da AUC de 0.693 (**Figuras 34C e 35C; Tabela 8**). O ensaio baseado na reatividade sérica de IgG total contra antígeno de L<sub>3</sub> apresentou um desempenho melhor que IgG1 para distinguir indivíduos verdadeiramente infectados e não infectados na área estudada (AUC=0,886, sensibilidade de 80% e especificidade de 83%); entretanto, esse anticorpo também demonstrou reatividade em indivíduos verdadeiramente negativos e não foi reativo em todos os indivíduos infectados (**Figuras 34A e 35A; Tabela 8**). Por outro lado, a reatividade sérica de IgG4 contra os antígenos de L<sub>3</sub> e Sv, apresentou o melhor desempenho para discriminar os indivíduos que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* e os controles verdadeiramente negativos para larvas ou qualquer outro parasito, com valores de AUC muito próximos a 1.000 (**Figuras 34B e D; 35B e D; Tabela 8**). A partir disso, utilizando os valores de corte estabelecidos com indivíduos infectados e não infectados selecionados, conseguimos avaliar os ensaios sorológicos em todos os moradores da comunidade de Vergel do Lago-Maceió estudada.





**Figura 34. Curva ROC da reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 contra preparações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* (L3 e Sv) em soros de moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil.**

Amostras de soros de indivíduos identificados por diferentes métodos parasitológicos (Padrão de Referência Consolidado) como verdadeiramente infectados por *S. stercoralis* (Ss Positivos/n=5) ou não infectados (Ss Negativos/n=30) foram utilizadas para determinar a curva ROC. Ss= *Strongyloides stercoralis*.



**Figura 35. Análise da curva TG-ROC da reatividade das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 contra preparações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* (L<sub>3</sub> e Sv).**

Os valores de corte para cada ensaio foram extrapolados a partir de cada ponto de intersecção das curvas de sensibilidade (representada por linhas com pontos) e especificidade (representada por linhas tracejadas).

**Tabela 8. Valores de corte para reatividade, sensibilidade, especificidade e área sob a curva (AUC) das imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG4 para os diferentes extratos antigênicos.**

	Igs	Valor de corte	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	AUC* (95% IC)
	IgG	> <b>0.09443</b>	80 (37.6 – 98.9)	83.3 (66.4 – 92.7)	0.886 (0.773 – 0.999)
<b>Ag L<sub>3</sub></b>	IgG1	> <b>0.02280</b>	60 (23.1 – 92.9)	60 (42.3 – 75.4)	0.693 (0.460 – 0.925)
	IgG4	> <b>0.08355</b>	100 (51.1 – 100)	100 (88.7 – 100)	1.00 (1.000 – 1.000)
<b>Ag Sv</b>	IgG4	> <b>0.06780</b>	100 (51.1 – 100)	93.3 (78.7 – 98.9)	0.983 (0.942 – 1.000)

Ag L<sub>3</sub>= Antígeno solúvel de larvas filarioides; Ag Sv= Antígeno solúvel de vermes adultos; Igs= Imunoglobulinas; AUC= Área sob a Curva ROC; Os valores entre parênteses indicam os intervalos de confiança (IC) de 95%. \*O valor de corte foi definido pela intersecção entre curvas de sensibilidade e especificidade obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos verdadeiramente infectados (n=5) e não infectados (n=61) selecionados da população do estudo.

### 6.2.5 Desempenho e sensibilidade dos testes sorológicos como ferramenta diagnóstica para infecção ativa por *Strongyloides stercoralis* na população em estudo

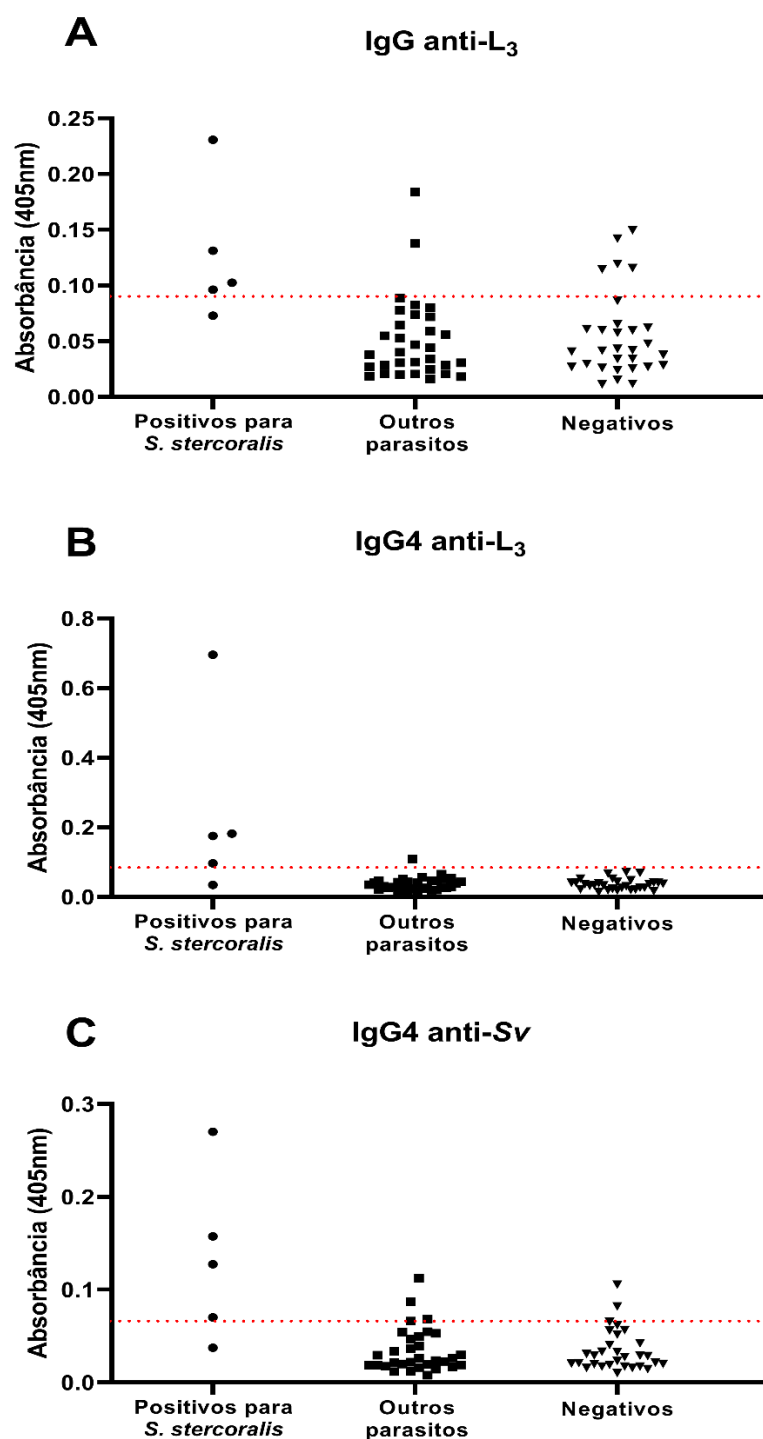
Dentre os testes avaliados, o ensaio baseado na reatividade sérica de IgG4 anti-L<sub>3</sub> apresentou o melhor desempenho com sensibilidade e especificidade de 80% e 98.3%, respectivamente; o cálculo do índice Kappa correspondente resultou em nível de concordância moderado 0.783 (0.544 – 1.023) e razão de verossimilhança de 49.6 (**Tabela 9**). A reatividade sérica do ensaio IgG4 anti-Sv também obteve bom desempenho, com sensibilidade de 80% e especificidade de 91.9%; O índice Kappa resultou com valor de 0.525 e razão de verossimilhança de 45.6 (**Tabela 9**). O ensaio de IgG total anti-L<sub>3</sub>, embora demonstrando sensibilidade semelhante à de IgG4 para identificar indivíduos que eliminaram larvas nas fezes, a especificidade deste ensaio foi menor, levando a uma concordância mais baixa com o teste parasitológico (**Tabela 9**). E em relação à reatividade sérica IgG1 anti-L<sub>3</sub>, não foi possível discriminar entre indivíduos verdadeiramente positivos de indivíduos verdadeiramente negativos. Esse ensaio apresentou um índice de concordância muito baixo ao teste parasitológico, sugerindo que essa subclasse não apresenta relevância no diagnóstico da estrogiloidíase.

**Tabela 9. Desempenho diagnóstico dos ensaios sorológicos IgG, IgG1 e IgG4 contra preparações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis* (L3 e Sv) em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil.** Cada ensaio foi avaliado quanto à sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança (LR) e índice Kappa em relação a um Padrão de Referência Consolidado (CRS) dos testes parasitológicos.

Igs	VP	FN	VN	FP	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	VPP (95% IC)	VPN (95% IC)	RV+ (95% IC)	KAPPA (95% IC)	
<b>Ag L<sub>3</sub></b> <b>(n=67)</b>	<b>IgG</b>	4	1	57	7	80 (37.6 – 96.3)	88.7 (78.5 – 94.4)	36.36 (15.2 – 64.6)	98.21 (90.5 – 99.7)	7.08 (4.73 – 10.6)	0.442 (0.225 – 0.660)
	<b>IgG1</b>	3	2	40	22	60 (23.0 – 88.2)	64.5 (52.0 – 75.2)	12 (4.16 – 29.9)	95.2 (84.2 – 98.7)	1.69 (1.00 – 2.86)	0.08636 (-0.068 – 0.241)
	<b>IgG4</b>	4	1	61	1	80 (37.5 – 96.3)	98.3 (91.4 – 99.7)	80 (37.5 – 96.3)	98.3 (91.4 – 99.7)	49.6 (6.18 – 398)	0.783 (0.544 – 1.023)
<b>Ag Sv</b> <b>(n=67)</b>	<b>IgG4</b>	4	1	57	5	80 (37.6 – 96.3)	91.9 (82.5 – 96.5)	44.4 (18.8 – 73.3)	98.3 (90.8 – 99.7)	45.6 (4.24 – 49.0)	0.5259 (0.298 – 0.753)

Igs= Imunoglobulinas; VP= Verdadeiramente positivos; FN= Falsos negativos; VN= Verdadeiramente negativos; FP= Falsos positivos; VPP= Valor preditivo positivo; VPN= Valor preditivo negativo; RV= razão de verossimilhança; IC= Intervalo de confiança; Ag L<sub>3</sub>= Antígeno solúvel de larvas filarioides; Ag Sv= Antígeno solúvel de vermes adultos.

Com o intuito de melhor avaliar a sensibilidade dos testes sorológicos na identificação dos indivíduos reativos, separamos a população estudada em indivíduos infectados por *S. stercoralis* (n=5), indivíduos infectados por outras parasitoses (n=32), e indivíduos sem nenhuma infecção parasitária detectável (n=30), de acordo o Padrão de Referência Consolidado obtido nos testes parasitológicos. Nossos dados mostraram que IgG4 anti-L<sub>3</sub> foi o único ensaio que não apresentou reatividade sérica nos indivíduos verdadeiramente negativos, além de ter corroborado com nosso resultado parasitológico na detecção de 80% dos indivíduos que eliminaram larvas de *S. stercoralis* nas fezes. O único indivíduo com outras parasitoses que foi reativo no ensaio de IgG4 anti-L<sub>3</sub> apresentava infecção por *G. lamblia* e também apresentava cistos do comensal *E. coli* (**Figura 36B**). Outros indivíduos com estes mesmos protozoários não foram reativos ou mesmo indivíduos com outras geohelmintoses ou com esquistossomose não apresentaram reatividade cruzada neste ensaio, indicando que este ensaio tem boa especificidade. A sensibilidade dos ensaios IgG anti-L<sub>3</sub> e IgG4 anti-Sv também foi de 80% para indivíduos com estrogiloidíase, contudo ambos os ensaios apresentaram reatividade para amostras sem infecção parasitária, onde IgG teve 16.7% de reativos (5 dos 30 indivíduos negativos) (**Figura 36A**), e IgG4 anti-Sv com 6.7% indivíduos reativos (2 dos 30 indivíduos negativos) (**Figura 36C**). Para reatividade a outras parasitoses, o teste IgG anti-L<sub>3</sub> foi reativo para dois indivíduos, sendo um para *Ascaris* sp. e outro para *S. mansoni* (**Figura 36A**); já teste IgG4 anti-Sv foi reativo em três indivíduos, um com *S. mansoni*, e outros dois com *G. lamblia* (**Figura 36C**). Vale ressaltar que o indivíduo infectado por *S. stercoralis* que não foi reativo em nenhum dos ensaios imunológicos, embora apresentando carga parasitária altíssima, era imunossuprimido pela infecção com vírus HIV, já na fase sintomática da doença (**Figura 36**).



**Figura 36. Especificidade dos ensaios sorológicos baseados na reatividade de IgG e IgG4 contra os antígenos de *Strongyloides venezuelensis* (L<sub>3</sub> ou Sv) para detectar indivíduos infectados por *S. stercoralis* em moradores da comunidade de Vergel do Lago, cidade de Maceió, Alagoas, Brasil.**

Amostras de soros de indivíduos identificados por diferentes métodos parasitológicos (CRS) como positivos para *S. stercoralis* (n= 5), outros parasitos (n=32) e negativos (n=30) foram utilizadas para os ensaios de ELISA. A linha horizontal demonstra o ponto de corte para reatividade dos indivíduos.

## ***7. DISCUSSÃO***

---

A estimativa de prevalência da estrogiloidíase tem aumentado nos últimos anos, tanto em áreas endêmicas como não endêmicas, devido à dificuldade de diagnóstico desta parasitose, ao déficit de saneamento básico e à falta de conhecimento sobre a doença pela população (PUTHIYAKUNNON *et al.*, 2014; PAGE; SPEARE, 2016). Além disso, esta infecção tem sido considerada a mais negligenciada entre as doenças tropicais que afetam a população humana (OLSEN *et al.*, 2009; SCHÄR *et al.*, 2013), especialmente devido às particularidades de desenvolvimento do seu agente etiológico e das limitações associadas ao diagnóstico correto (PUTHIYAKUNNON *et al.*, 2014; GELAYE *et al.*, 2021). Isto permite a persistência da infecção e a possibilidade de evolução para casos graves de estrogiloidíase. Assim, a Organização Mundial da Saúde atualizou recentemente os seus objetivos para priorizar os esforços para o aprimoramento das medidas de controle da estrogiloidíase até 2030, incentivando o desenvolvimento de estudos que levem ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, sensíveis e fáceis de usar para o mapeamento e vigilância desta parasitose (WHO, 2020). Neste estudo, avaliamos a eficácia de modificações introduzidas em uma técnica parasitológica de concentração de larvas do parasito e a reatividade de diferentes isotipos de anticorpos aos diferentes antígenos de *S. venezuelensis*, a partir de infecções experimentais em ratos e com a utilização de amostras humanas coletadas em área endêmica. Nossos dados mostraram que modificações implementadas ao diagnóstico parasitológico de fezes pela técnica de Rugai e a sorologia baseada na reatividade de IgG4 a antígenos heterólogos de larvas infectantes de *S. venezuelensis*, aumentaram a sensibilidade do diagnóstico de infecção por *S. stercoralis* em indivíduos residentes em áreas endêmicas e infectados com baixa carga parasitária.

Em relação ao diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase, os métodos de concentração utilizados para detecção de larvas de *Strongyloides* em amostras de fezes apresentam melhor sensibilidade. Entre estes, a técnica de Baermann é a mais utilizada em estudos epidemiológicos e ensaios clínicos (GELAYE *et al.*, 2021). No entanto, este método é trabalhoso e não é aplicado rotineiramente na maioria dos laboratórios clínicos (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013). Com base nos princípios da técnica de Baermann, Rugai e colaboradores (1954) desenvolveram um método simples com sensibilidade semelhante para o diagnóstico da estrogiloidíase. O método Rugai original (RO) utiliza apenas copo cônico, gaze e pipeta, o que facilita seu emprego em condições de campo. Neste estudo, modificamos algumas etapas



da técnica de Rugai para melhorar a recuperação larval e tornar o sedimento fecal remanescente mais limpo e fácil de ser visualizado, aumentando assim a sensibilidade do diagnóstico. Nossos dados demonstraram que as modificações aplicadas à técnica de Rugai melhoraram significativamente a detecção de larvas de *Strongyloides* spp. em amostras fecais derivadas de ratos infectados experimentalmente e de indivíduos humanos naturalmente infectados. Além disso, o sedimento recuperado obtido pela técnica de Rugai-modificado (RMOD) ficou mais limpo e mais fácil de avaliar ao microscópio óptico.

Até onde sabemos essa é a primeira modificação aplicada à técnica original de Rugai, que incluiu a incorporação de vermiculita média expandida nas amostras de fezes, facilitou a migração larval em direção à água morna. A mistura fezes-vermiculita não fica compactada, o que permite a avaliação de grande quantidade de fezes, aumentando ainda mais a sensibilidade deste teste parasitológico. Além disso, a técnica RMOD permite avaliar qualitativamente amostras fecais diarreicas, o que supera uma limitação inerente aos testes originais de Rugai e Baermann-Moraes (KROLEWIECKI; NUTMAN, 2019), uma vez que a vermiculita expandida ou o carvão granulado absorvem a maior parte do líquido nesse tipo de amostra. Outra modificação importante introduzida no teste original foi um filtro adicional preparado com pano de limpeza multiuso, que é um material barato que permite a migração das larvas do parasito e retém a maior parte dos restos fecais. Essa adaptação proporciona um sedimento menos denso, que pode ser completamente examinado por microscopia óptica e favorece a visualização e identificação das larvas do parasito. Portanto, no presente estudo, nossas avaliações comparativas entre as técnicas RO e RMOD, usando as mesmas amostras de fezes de ratos infectados experimentalmente, demonstraram que o teste RMOD recuperou um número significativamente maior de larvas em um sedimento limpo e fácil de ser analisado.

Após confirmar que o RMOD melhorou a recuperação larval e facilitou a análise de amostras fecais de ratos infectados, comparou-se o desempenho do RMOD, cultura em placa de ágar (CPA) e sedimentação espontânea (SS) na detecção e quantificação da infecção por *S. venezuelensis* em ratos experimentalmente infectados com baixa ou alta carga. Também se examinou o desempenho desses diferentes testes parasitológicos para avaliar a cura desta infecção parasitária após o tratamento com ivermectina ou o possível aumento da carga parasitária após o tratamento com imunossupressor. Mais uma vez, os dados experimentais

demonstraram melhor desempenho do método RMOD na detecção e recuperação de larvas do parasito em todos os grupos experimentais avaliados, principalmente nos grupos infectados com baixa carga parasitária.

A SS é o método de diagnóstico parasitológico rotineiramente utilizado em laboratórios de análises clínicas e em estudos epidemiológicos devido ao seu baixo custo, facilidade de manuseio e capacidade de detectar protozoários e helmintos em amostras formadas, pastosas e semipastosas (CARVALHO *et al.*, 2012). Porém, na utilização deste método, a amostra de fezes obtida para análise resulta em um sedimento com grande quantidade de detritos fecais, o que dificulta o exame microscópico adequado. Além disso, como a técnica SS não possui etapas adicionais de concentração para larvas, este teste diagnóstico apresenta baixa sensibilidade para detecção da infecção por *Strongyloides*, principalmente porque esse parasito produz diariamente um número muito pequeno de larvas (CAMPO-POLANCO *et al.*, 2014). Esses resultados foram confirmados em nosso estudo experimental, principalmente em ratos com baixa carga parasitária ou após tratamento anti-helmíntico.

A técnica CPA é atualmente considerada o teste mais sensível para o diagnóstico de *S. stercoralis*, pois permite o desenvolvimento do parasito simulando características climáticas e físico-químicas naturais e melhor visualização das larvas durante a análise (KAEWRAT *et al.*, 2020). Apesar de ser utilizado em laboratórios como teste padrão para o diagnóstico de casos de estrogiloidíase em países endêmicos (KRISTANTI *et al.*, 2018; KAEWRAT *et al.*, 2020), este método parasitológico é caro, requer maior tempo para obter resultados e muitas vezes é incapaz de detectar infecções com carga parasitária muito baixa (TOLEDO *et al.*, 2015; KETZIS, 2017). Dados apresentados neste estudo utilizando ratos experimentalmente infectados, indicam que a técnica de RMOD demonstrou eficácia comparável ou potencialmente superior na detecção de larvas de *Strongyloides* spp., quando comparado ao CPA. Além disso, o RMOD oferece a vantagem de ser um método mais simples em termos de execução e análise.

Alguns estudos indicam que métodos sorológicos podem ser uma alternativa complementar, sensível e específica, capaz de detectar a estrogiloidíase mesmo em hospedeiros com baixa carga parasitária (BUONFRATE *et al.*, 2015; CAMPO POLANCO *et al.*, 2014), entretanto, sua utilização como alternativa para o diagnóstico da estrogiloidíase ainda demanda uma melhor avaliação. Utilizando infecções

experimentais em ratos Wistar para avaliar a reatividade de diferentes isotipos de anticorpos contra antígenos de *S. venezuelensis*, demonstramos que alguns anticorpos foram capazes de detectar a infecção ativa, mesmo em animais infectados com baixa carga e/ou imunossuprimidos, como também podem ser usados como controle de cura.

Inicialmente, avaliamos a reatividade de IgM aos antígenos de *Strongyloides* e observamos que seus níveis apresentaram elevação precoce nos diferentes grupos experimentais com animais infectados. A reatividade de IgM permaneceu elevada no plasma até 60 dias após a infecção, mesmo em grupos infectados com baixa carga que receberam tratamento com ivermectina e que tiveram a cura parasitológica constatada, sugerindo que a reatividade de IgM à antígenos de *Strongyloides* pode não ter valor diagnóstico especialmente em áreas endêmicas. De fato, IgM é a primeira imunoglobulina que pode ser detectada em indivíduos com estrogiloidíase, apresentando aumento durante a infecção aguda e permanecendo elevada por duas a três semanas após a infecção (GROVE, 1996; PORTO *et al.*, 2001; MARCOS *et al.*, 2001; MARCOS *et al.*, 2008). Embora o modelo experimental não permita uma boa avaliação da cronicidade da infecção, já foi demonstrado que a reatividade IgM é difícil de detectar em amostras de soro de pacientes com infecção por *S. stercoralis* (TOLEDO *et al.*, 2015). Além disso, os dados do presente estudo demonstraram que a reatividade plasmática de IgM não permitiu diferenciar a infecção ativa com baixa carga de animais tratados e curados. Entretanto, alguns estudos sugerem que a reatividade de IgM pode ser utilizada para fins de triagem diagnóstica em indivíduos com suspeita de infecção por *S. stercoralis*, especialmente em áreas não endêmicas, pois seus níveis são muito elevados no início da infecção e podem permanecer detectáveis por longos períodos (ARIFIN *et al.*, 2019). Adicionalmente, é importante destacar que os níveis de IgM parasito específica permaneceram elevados durante o período de imunossupressão dos ratos infectados e tratados com dexametasona, o que sugere que esse anticorpo também poderia ser aplicado no diagnóstico sorológico de indivíduos imunossuprimidos.

Também avaliamos a reatividade de IgG total aos vários antígenos de *S. venezuelensis* em diferentes grupos experimentais, já que IgG é a principal classe de imunoglobulina presente no soro, representando 70–75% do total de anticorpos séricos (ARIFIN *et al.*, 2019). Os dados mostraram que a cinética da reatividade de IgG foi semelhante ao detectado para IgM, exceto pela queda significativa da

reatividade de IgG aos diferentes antígenos testados aos 20 dpi no grupo de animais que foram submetidos ao tratamento com dexametasona. Apesar da redução significativa da reatividade de IgG durante o período de efeito do tratamento imunossupressor, a reatividade plasmática de IgG não retornou aos valores basais, independente da carga parasitária. Semelhante ao detectado no estudo utilizando ratos experimentalmente infectados, estudos realizados com pacientes infectados por *S. stercoralis* também mostraram que a reatividade de IgG se eleva após a sexta semana de infecção, permanecendo elevados por longos períodos, mesmo após o tratamento (MARCOS *et al.*, 2011; ARIFIN *et al.*, 2018; FRADEJAS *et al.*, 2018; BOONROUMKAEW *et al.*, 2020), sugerindo que a reatividade de IgG pode não ser marca de infecção ativa pelo parasito. Outras limitações para a utilização da reatividade de IgG total no diagnóstico sorológico seria a ocorrência de reações cruzadas com outros helmintos (LINDO; LEE, 2001; VAN DOORN *et al.*, 2007; ARIFIN *et al.*, 2019). Dessa forma, a avaliação da cinética de diferentes subtipos de IgG durante a infecção por *Strongyloides* pode ser essencial para melhorar acurácia do diagnóstico sorológico desse parasito.

Embora seja relatado que indivíduos infectados por *S. stercoralis* induzam uma resposta humoral com produção de diferentes classes e/ou subclasses de anticorpos ao longo da infecção (ATKINS *et al.*, 1997, 1999; BONNE-ANNÉE *et al.*, 2011; TOLEDO *et al.*, 2015), até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a cinética da reatividade dos isotipos IgG1 e IgG2a em ratos infectados com diferentes cargas parasitárias de *S. venezuelensis* e submetidos ao tratamento com anti-helmíntico ou imunossuprimidos. O anticorpo IgG1 em ratos está associado a resposta de perfil Th1 e é equivalente ao IgG1 em humanos, enquanto a produção de IgG2a está associada a produção de IL-4 e da resposta predominantemente Th2, sendo equivalente a produção de IgG4 em humanos (KIM *et al.*, 2007). Os dados deste estudo demonstraram um aumento significativo e progressivo da reatividade de IgG1 aos antígenos de larvas e de verme adulto no plasma de ratos infectados, independente da carga parasitológica. Este aumento é mais tardio, especialmente nos animais com baixa carga parasitária, mas não reduz após a eliminação espontânea dos vermes aos 35 dpi. Por outro lado, a resposta de IgG1 aos antígenos excretos-secretados do parasito, especialmente das larvas, foi muito baixa impossibilitando sua diferenciação com relação ao controle não infectado, independente da carga parasitária. Também é interessante notar que nos animais tratados com anti-

helmíntico a reatividade de IgG1 não aumenta após a administração de ivermectina retornando aos níveis basais somente nos animais infectados com baixa carga parasitária. Por outro lado, o nível de reatividade do isotipo IgG2a foi a que apresentou melhor desempenho no diagnóstico da estrogiloidíase experimental apresentado neste estudo, pois foi capaz de diferenciar animais infectados de animais tratados e que tiveram cura parasitológica, inclusive em ratos com baixa carga parasitária. Estudos anteriores já demonstraram que animais infectados por *Strongyloides* sp tiveram elevação de IgG2a em comparação com animais não infectados (WILKES *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2023). Contudo, esses trabalhos não avaliaram o desempenho desse anticorpo para o diagnóstico da estrogiloidíase. Portanto, nossos dados indicam que o aumento da reatividade plasmática de IgG2a, um isotipo associado à resposta Th2 induzida predominantemente durante infecções helmínticas, pode ser um bom marcador de infecção ativa por *Strongyloides* spp.

Também avaliamos a reatividade de IgA contra diferentes antígenos de *Strongyloides*. Demonstramos uma baixa reatividade desta classe de anticorpo no plasma de ratos infectados de diferentes grupos experimentais; entretanto, nas amostras de lavado intestinal, houve alta reatividade de IgA em ratos infectados com alta e com baixa carga parasitária. Além disso, após a cura parasitológica dos ratos infectados, os níveis de IgA anti-ES/L3 retornaram aos valores basais. O anticorpo IgA é a classe mais proeminente nas secreções mucosas, apresentando pico de produção no início da segunda semana de infecção por *S. stercoralis*, e permanecendo elevado até a quinta semana (RIBEIRO *et al.*, 2010, LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014 ; ARIFIN *et al.*, 2019). A produção de IgA está associada ao ciclo de vida do parasito que interage com a mucosa dos pulmões e intestino. Portanto, a presença de IgA em amostras de secreção pode representar infecção ativa e possíveis casos de reinfecção (MCGHEE; MESTECKY, 1990). Assim, testes imunológicos negativos para presença de IgA anti-*Strongyloides* ou que demonstrem sua redução progressiva podem indicar a eliminação do parasito (MESTECKY; RUSSELL, 2009; BOSQUI *et al.*, 2015). Esses dados, juntamente com nossos achados, sugerem que testes diagnósticos para detectar IgA em amostras de secreção podem ser capazes de encontrar indivíduos com infecção ativa por *Strongyloides*.

Além dos anticorpos, outros elementos da resposta imune contra *Strongyloides*, como os granulócitos circulantes no sangue periférico, podem ajudar a complementar o diagnóstico imunológico da estrogiloidíase. Assim, demonstramos

que apenas os eosinófilos permaneceram significativamente elevados durante todo o período de infecção; entretanto, em animais infectados tratados com anti-helmíntico, o número de eosinófilos circulantes diminuiu significativamente imediatamente após o tratamento. Tradicionalmente, os eosinófilos têm sido considerados as principais células efetoras envolvidas na proteção contra infecções helmínticas (HUANG; APPLETON, 2017). Especificamente, na estrogiloidíase, a presença de eosinofilia é frequente e pode ser duradoura, mesmo em casos assintomáticos (LÖSCHER; SAATHOFF, 2008). Contudo, do ponto de vista clínico, o aumento da contagem de eosinófilos no sangue periférico é um sinal inespecífico, pois tanto as doenças parasitárias como as alérgicas podem induzir um aumento no número destas células (ROUFOSSE *et al.*, 2007; MARICHAL *et al.*, 2017). Entre os poucos estudos que utilizaram a eosinofilia para detectar a estrogiloidíase, os principais achados foram encontrados em viajantes, imigrantes e refugiados que visitaram ou viveram em áreas endêmicas (SEYBOLT *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 2022); entretanto, os exames parasitológicos desses indivíduos não foram realizados, o que não permite concluir que a eosinofilia esteve associada à infecção por *S. stercoralis*. Nossos dados também sugerem que os eosinófilos podem auxiliar no diagnóstico complementar de uma infecção ativa, uma vez que sua redução ocorreu após a eliminação do parasito, inclusive em animais infectados com baixa carga parasitária.

Realizamos também a avaliação do desempenho dos testes de maior sensibilidade no modelo experimental, em amostras biológicas obtidas de população humana de áreas com presença de geohelmintos. As técnicas parasitológicas revelaram elevada prevalência de esquistossomose intestinal na população estudada além da presença de indivíduos com outros parasitos intestinais, provavelmente como consequência das precárias condições socioeconômicas e sanitárias da área de estudo, favorecendo a transmissão de diversas infecções parasitárias (TAMANO *et al.*, 2015). Conforme discutido anteriormente, apesar de permitir a identificação de uma ampla gama de parasitos presentes nas fezes (CARVALHO *et al.*, 2012), a técnica SS apresenta baixa sensibilidade para detecção da infecção por *S. stercoralis*. A técnica Helmitex, que foi utilizada apenas no estudo da população humana, detectou apenas indivíduos infectados por *S. mansoni*, e os métodos de concentração larval RMOD e CPA detectaram apenas larvas de parasitos nas amostras fecais humanas, conforme já discutido (CAMPO POLANCO *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2023).

A prevalência estimada de 8,8% para estrogiloidíase encontrada na população estudada, conforme determinado pelo Padrão de Referência Consolidado (CRS) que criamos, confirma os resultados obtidos em inquéritos anteriores realizados no Estado de Alagoas (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; CHAMONE *et al.*, 2020). Além disso, demonstramos que o RMOD apresentou a melhor sensibilidade para detecção de larvas de *Strongyloides* em amostras fecais humanas, seguido por CPA e SS. Esses achados estão de acordo com nossos dados experimentais obtidos com ratos infectados por *S. venezuelensis*. Um estudo anterior em uma população humana demonstrou que as técnicas de Baermann e CPA apresentaram sensibilidade de 81% e 58% na detecção de larvas de *S. stercoralis*, respectivamente (KROLEWIECKI *et al.*, 2010). Embora a técnica de Rugai não tenha sido realizada no estudo citado anteriormente, os autores confirmaram que métodos de concentração baseados em hidro e termotropismo, como os métodos de Baermann e Rugai, são mais eficazes na detecção de infecções por *Strongyloides* spp. Em contrapartida, outro estudo demonstrou que a técnica CPA foi mais sensível na detecção de infecção por *S. stercoralis* (87,9%), seguida pela técnica Rugai (60,6%) e SS (45,4%) (Sitta *et al.*, 2014). Nossos dados, tanto para infecções experimentais como naturais, confirmam que as modificações implementadas na técnica de Rugai aumentaram consideravelmente seu desempenho e melhoraram a recuperação e detecção de larvas de *Strongyloides* spp.

Também investigamos o desempenho diagnóstico dos anticorpos IgG, IgG1 e IgG4 contra os antígenos de *S. venezuelensis* com melhor desempenho nos testes experimentais em amostras de soro da população humana. Nossos dados revelaram que a reatividade de IgG total anti-*Strongyloides* foi estatisticamente maior em indivíduos verdadeiramente infectados que indivíduos sem a presença de larvas; no entanto, alguns indivíduos que não estavam eliminando larvas nas fezes, também apresentaram reatividade IgG alterada. Com isso, a especificidade deste ensaio foi menor, levando a uma concordância mais baixa com o CRS parasitológico. Segundo dados apresentados por Tamarozzi e colaboradores (2021), a especificidade do ensaio sorológico baseado na reatividade de IgG melhora ao utilizar antígenos recombinantes NIE/SsIR de *Strongyloides* no lugar de extrato bruto do parasito, atingindo taxas de 92% e 91% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Entretanto, quando IgG anti-NIE/SsIR foi analisado contra o CRS baseado na combinação de resultados dos testes fecais e sorológicos, o ELISA IgG apresentou

redução da sensibilidade (78%) e aumento de especificidade (98%) (TAMAROZZI *et al.*, 2021). Por sua vez, a reatividade IgG1 anti-*Strongyloides* demonstrou baixo valor diagnóstico para detecção da estrogiloidíase em indivíduos que vivem na área endêmica. Em um estudo realizado por De Souza e colaboradores (2020) demonstraram que embora o teste IgG1-ELISA tenha apresentado alta sensibilidade e especificidade na detecção de indivíduos imunocompetentes infectados por *S. stercoralis*, a imunorreatividade desse teste foi baixa em pacientes alcoólatras com infecção confirmada, identificando apenas 57% (42/74) dos infectados por *S. stercoralis*. Ressalta-se também, que esse ensaio em nosso estudo apresentou um índice de concordância muito baixo em relação ao teste parasitológico, sugerindo que essa subclasse não apresenta acurácia no diagnóstico da estrogiloidíase.

Em contrapartida, nossos dados mostraram que a reatividade de IgG4 anti-*Strongyloides* apresentou alto desempenho diagnóstico para discriminar entre os indivíduos que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* e indivíduos negativos para larvas ou qualquer outro parasito, sendo o único ensaio a não apresentar reatividade sérica para indivíduos verdadeiramente negativos. Além disso, em relação CRS baseado nos testes parasitológicos, o ensaio de IgG4 anti-*Strongyloides* apresentou sensibilidade e especificidade de 80% e 98.3%, respectivamente, e nível de concordância moderado (coeficiente kappa > 0.7). De fato, os níveis de IgG4 são mantidos por regulação positiva, como resultado da estimulação antigênica prolongada em infecções crônicas por estrogiloidíase (ATKINS *et al.*, 1997), e segundo alguns estudos, esse anticorpo pode ser detectado duas semanas após a infecção por *S. stercoralis* e pode persistir por até 20 semanas (ARIFIN *et al.*, 2019). Ao longo dos anos, sem avaliar especificamente a eficácia da reatividade IgG4 como ferramenta no diagnóstico da estrogiloidose humana, alguns estudos já demonstravam que os níveis de IgG4 são elevados em indivíduos com infecção ativa por *S. stercoralis*, em comparação com indivíduos tratados e curados (SATOH *et al.*, 1999 e 2004; NORSYAHIDA *et al.*, 2013), o que confirma os resultados do nosso estudo. Mais recentemente um estudo demonstrou que o teste de IgG4 contra o antígeno bruto de *S. rattii* na urina apresentou sensibilidade de 91,4% e especificidade de 93,2%, enquanto a IgG4 sérica apresentou sensibilidade de 93,6% e especificidade de 91,0%, com concordância diagnóstica quase perfeita ao exame parasitológico (WONGPHUTORN *et al.*, 2023). Outro estudo demonstrou que teste IgG4 contra antígeno de larvas de *S. venezuelensis* apresentou melhores taxas de sensibilidade e



especificidade, e sendo melhor ensaio para diagnóstico de infecção por *S. stercoralis* tanto para indivíduos alcoólicos como não alcoólicos (DE SOUZA *et al.*, 2020). Esses dados corroboram com nossos achados, sugerindo que o IgG4 é um dos anticorpos mais promissores que podem ser utilizados em testes de diagnóstico imunológico para estrogiloidíase.

Embora tenhamos conseguido demonstrar o excelente desempenho da técnica RMOD na recuperação e detecção de larvas de *Strongyloides* em comparação com outras técnicas, e o uso promissor da reatividade de IgG4 como teste de diagnóstico para estrogiloidíase, nosso estudo teve algumas limitações inerentes, como o pequeno número de amostras de fezes e soro da população humana analisadas. Outra limitação importante foi o exame de uma única amostra fecal por residente, o que pode ser considerado insuficiente para excluir a infecção por *S. stercoralis* devido à eliminação esporádica e intermitente de larvas nas fezes (SIDDIQUI; BERK, 2001). Neste sentido, é possível que o indivíduo com giardíase que foi reativo a IgG4 anti-*Strongyloides* poderia ter uma infecção por *S. stercoralis* não detectada pelos testes parasitológicos realizados em uma única amostra fecal, e não uma reação inespecífica. Contudo, nosso ensaio IgG4 anti-*Strongyloides* pode ser aprimorado para o desenvolvimento de um teste rápido imunocromatográfico, que pode ser utilizado em análises laboratoriais de rotina e em estudos epidemiológicos para triagem de indivíduos reativos para *S. stercoralis*. Além disso, nossa técnica parasitológica RMOD, que foi consideravelmente mais sensível e fácil de implementar em laboratório ou em condições de campo, poderia ser usada nesses indivíduos reativos para confirmar a infecção. Porém, afim de estabelecer um protocolo ainda mais sólido, pretendemos aumentar o nosso esforço amostral em estudos subsequentes para avaliar melhor o desempenho do método RMOD e do ensaio IgG4 anti-*Strongyloides* em diferentes populações humanas.

## **8. CONCLUSÃO**

---

Diante do que foi exposto, os resultados do presente estudo indicam que:

- O teste parasitológico de Rugai-modificado apresentou melhor sensibilidade na detecção de larvas de *Strongyloides* em modelo experimental e população humana, quando comparado a outras técnicas parasitológicas que foram utilizadas;
- A técnica RMOD é consideravelmente mais fácil de implementar em laboratório ou em condições de campo do que os outros métodos avaliados, e as alterações implementadas, destinadas a aumentar a migração larval e obter sedimentos fecais mais limpos, são viáveis;
- O início da infecção experimental foi marcado pelo aumento de leucócitos totais, que retomaram a níveis basais após duas semanas, no entanto, aumento essencialmente de eosinófilos permaneceu durante toda infecção, sugerindo que essa célula pode ser associada a infecção ativa;
- O antígeno solúvel de L<sub>3</sub> apresentou melhor acurácia nos testes de ELISA padronizados em modelo experimental e população humana;
- Os isotipos IgG e IgG1 não são bons marcadores para separar infecção ativa e de passada, mas podem ser utilizados para triagem;
- O isotipo IgG2a contra antígenos solúveis de L<sub>3</sub> ou Verme foi capaz de detectar e separar infecção ativa e/ou animais infectados que foram curados, bem como o isotipo IgG4 anti-L<sub>3</sub> obteve melhor desempenho no diagnóstico da estrogiloidíase humana;
- O teste IgA anti-L<sub>3</sub> realizado em lavado intestinal apresentou resultado promissor para identificação de animais infectados e de animais curados pós tratamento.

Portanto, esse estudo fornece importantes dados para uso desses métodos no diagnóstico mais sensível para estrogiloidíase, inclusive para a identificação de indivíduos assintomáticos e/ou com baixa carga parasitária, onde a técnica RMOD e o ensaio de ELISA baseado na reatividade de IgG4 anti-L<sub>3</sub> em conjunto apresentaram melhor desempenho para detecção da infecção por *Strongyloides* spp.

## ***REFERÊNCIAS***

---

ABCAM. **Strongyloides IgG/IgM ELISA kit (ab247203)**. EUA: Copyright © Abcam plc, 2019. 16 p. Disponível em:  
[https://www.abcam.com/ps/products/247/ab247203/documents/Strongyloides-IgG-IgM-ELISA-kit-protocol-book-ab247203%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/247/ab247203/documents/Strongyloides-IgG-IgM-ELISA-kit-protocol-book-ab247203%20(website).pdf)

ADAMSOM, M.L. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, p. 1478-1482, 1987.  
<http://dx.doi.org/10.1139/z87-230>

AL MALKI, M.M.; SONG, J.Y. *Strongyloides* hyperinfection syndrome following haematopoietic stem cell transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 172, n. 4, p. 496, 2016. <https://doi.org/10.1111/bjh.13814>

ALBARQI, M.M.; STOLTZFUS, J.D.; PILGRIM, A.A.; NOLAN, T.J.; WANG, Z.; KLIEWER, S.A.; MANGELSDORF, D.J.; LOK, J.B. Regulation of life cycle checkpoints and developmental activation of infective larvae in *Strongyloides stercoralis* by dafachronic acid. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005358, 2016.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005358>

ALBERTSON, D.G.; NWAORGU, O.C.; SULSTON, J.E. Chromatin diminution and a chromosomal mechanism of sexual differentiation in *Strongyloides papillosus*. **Chromosoma**, v. 75, n. 1, p. 75–87, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF00330626>

AL-MEKHLAFI, H.M.; NASR, N.A.; LIM, Y.; ELYANA, F.N.; SADY, H.; ATROOSH, W.M.; DAWAKI, S.; ANUAR, T.S.; NOORDIN, R.; MAHMUD, R. Prevalence and risk factors of *Strongyloides stercoralis* infection among Orang Asli schoolchildren: new insights into the epidemiology, transmission and diagnosis of strongyloidiasis in Malaysia. **Parasitology**, v. 146, n. 12, p. 1602-1614, 2019.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182019000945>

ALTINTOP, L.; CAKAR, B.; HOKELEK, M.; BEKTAS, A.; YILDIZ, L.; KARAOGLANOGLU, M. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis and bronchial asthma: a case report. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 27, 2010. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-27>

ANDERSON, N.W.; KLEIN, D.M.; DORNINK, S.M.; JESPERSEN, D.J.; KUBOFCIK, J.; NUTMAN, T.B.; MERRIGAN, S.D.; COUTURIER, M.R.; THEEL, E.S. Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 21, p. 732-736, 2014.  
<https://doi.org/10.1128/CVI.00041-14>

ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; SHEN, K.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Systemic cytokine profiles in *Strongyloides stercoralis* infection and alterations following treatment. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 2, p. 425–431, 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.01354-15>

ARAKAKI, T.; HASEGAWA, H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool.

**The Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, p. 11-17, 1988.  
<https://doi.org/10.2149/tmh1973.16.11>

ARAKAKI, T.; IWANAGA, M.; KINJO, F.; SAITO, A.; ASATO, R.; IKESHIRO, T. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 425–428, 1990.

ARAÚJO, E.S. Avaliação da participação da citocina IL-33 e de mastócitos na resposta imune protetora e na evolução das alterações pulmonares e intestinais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte 2014.

ARIFIN, N.; HANAFIAH, K.M.; AHMAD, H.; NOORDIN, R. Serodiagnosis and early detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 52, n. 3, p. 371–378, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.10.001>

ARIFIN, N.; YUNUS, M.H.; NOLAN, T.J.; LOK, J.B.; NOORDIN, R. Identification and preliminary evaluation of a novel recombinant protein for serodiagnosis of strongyloidiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 4, p. 1165–1170, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0697>.

ATKINS, N.S.; LINDO, J.F.; LEE, M.G.; CONWAY, D.J.; BAILEY, J.W.; ROBINSON, R.D.; BUNDY, D.A. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 609–613, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(97\)90049-3](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(97)90049-3).

ATKINS, N.S.; CONWAY, D.J.; LINDO, J.F.; BAILEY, J.W.; BUNDY, D.A. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 10, p. 517–526, 1999.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00248.x>

ATUL, S.; AJAY, D.; RITAMBHARA, N.; HARSH, M.; ASHISH, B. An unusual cause of malabsorption in an immunocompetent host. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 17, n. 1, p. 85-86, 2005.

BAEK, B.K.; ISLAM, M.K.; KIM, B.S.; LIM, C.W.; HUR, J.; OLUOCH, A.O.; KIM, C.H.; KAKOMA, I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 217-27, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00085-2)

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) Larven em Erdproben. **Geneeskd Tijdschr Ned Indie**, v. 57, p.131–137, 1917.

BAILEY, J.W. A serological test for the diagnosis of *Strongyloides* antibodies in ex Far East Prisoners of War. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 241-247, 1989. <https://doi.org/10.1080/00034983.1989.11812338>

BALACHANDRA, D.; AHMAD, H.; ARIFIN, N.; NOORDIN, R. Direct detection of *Strongyloides* infection via molecular and antigen detection methods. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, n. 1, p. 27–37, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03949-x>.

BARÇANTE, J.M.; BARÇANTE, T.A.; DIAS, S.R.; VIEIRA, L.Q.; LIMA, W.S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitology Research**, v. 89, n. 2, p. 89-93, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0719-z>

BARROS, N.; WOLL, F.; WATANABE, L.; MONTES, M. Are increased Foxp3+ regulatory T cells responsible for immunosuppression during HTLV-1 infection? Case reports and review of the literature. **BMJ Case Reports**, v. 2012, p. bcr2012006574, 2012. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-006574>

BARROS, N.; MONTES, M. Infection and Hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*: Clinical Presentation, Etiology of Disease, and Treatment Options. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 223–228, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0030-y>

BARRY, M.A.; SIMON, G.G.; MISTRY, N.; HOTEZ, P.J. Global trends in neglected tropical disease control and elimination: impact on child health. **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, n. 8, p. 635–641, 2013. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-302338>

BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P.J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521–1532, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; MUÑOZ, J.; KROLEWIECKI, A.J.; GOTUZZO, E.; MENA, M.A.; CHIODINI, P.L.; ANSELMINI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2214, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>.

BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; SEQUI, M.; MEJIA, R.; CIMINO, R.O.; KROLEWIECKI, A.J.; ALBONICO, M.; GOBBO, M.; BONAFINI, S.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; NUTMAN, T.B. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2640, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002640>.

BLAXTER, M.L.; DE LEY, P.; GAREY, J.R.; LIU, L.X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J.R.; MACKAY, L.Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L.M.; VIDA, J.T.; THOMAS, W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 71–75, 1998. <https://doi.org/10.1038/32160>

BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J.A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic Research**, v. 51, n. 2-3, p. 205-14, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8258-2>

BOONROUMKAEW, P.; SADAOW, L.; SANPOOL, O.; RODPAI, R.; THANCHOMNANG, T.; PHUPIEWKHAM, W.; INTAPAN, P.M.; MALEEWONG, W. Effectiveness of *Strongyloides* Recombinant IgG Immunoreactive Antigen in Detecting IgG and IgG4 Subclass Antibodies for Diagnosis of Human Strongyloidiasis Using Rapid Immunochromatographic Tests. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 9, p. 615, 2020. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090615>.

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

BOSQUI, L.R.; GONÇALVES, A.; GONÇALVES-PIRES, M.; PAVANELLI, W.R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J.M.; COSTA, I.N. Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1090–1094, 2018a. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002232>.

BOSQUI, L.R.; MARQUES, P.D.; DE MELO, G.B.; GONÇALVES-PIRES, M.; MALTA, F.M.; PAVANELLI, W.R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J.M.; PAULA, F.M.; COSTA, I.N. Molecular and Immune Diagnosis: Further Testing for Human Strongyloidiasis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 22, n. 4, p. 485–491, 2018b. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0340-1>.

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

BRENNER, Z.; CHAIA, G. Isolamento e manutenção do *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 20, p. 447-451, 1960.

BRIGANDI, R.A.; ROTMAN, H.L.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Chronicity in *Strongyloides stercoralis* infections: dichotomy of the protective immune response to infective and autoinfective larvae in a mouse model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 6, p. 640–646, 1997. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.640>

BUONFRATE, D.; BISANZIO, D.; GIORLI, G.; ODERMATT, P.; FÜRST, T.; GREENAWAY, C.; FRENCH, M.; REITHINGER, R.; GOBBI, F.; MONTRESOR, A.; BISOFFI, Z. The Global Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Infection. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 468, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060468>



BUONFRATE, D.; FORMENTI, F.; PERANDIN, F.; BISOFFI, Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Microbiology and Infection** (the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), v. 21, n. 6, p. 543–552, 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.001>

BUONFRATE, D.; REQUENA-MENDEZ, A.; ANGHEBEN, A.; CINQUINI, M.; CRUCIANI, M.; FITTIPALDO, A.; GIORLI, G.; GOBBI, F.; PIUBELLI, C.; BISOFFI, Z. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection-A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006229, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006229>

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

BUONFRATE, D.; SEQUI, M.; MEJIA, R.; CIMINO, R.O.; KROLEWIECKI, A.J.; ALBONICO, M.; DEGANI, M.; TAIS, S.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; NUTMAN, T.B.; BISOFFI, Z. Accuracy of five serologic tests for the follow up of *Strongyloides stercoralis* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003491, 2015b. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003491>

CAMPO POLANCO, L.F.; GUTIÉRREZ, L.A.; CARDONA ARIAS, J. Infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). **Revista Española de Salud Pública**, v. 88, n. 5, p. 581-600, 2014. <https://dx.doi.org/10.4321/S1135-57272014000500004>

CAMPO-POLANCO, L.F.; SARMIENTO, J.; MESA, M.A.; FRANCO, C.; LÓPEZ, L.; BOTERO, L.E.; BUILES, L. Strongyloidiasis in humans: diagnostic efficacy of four conventional methods and real-time polymerase chain reaction. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 493–502, 2018. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0055-2018>

CANÇADO, G.G.; FIUZA, J.A.; DE PAIVA, N.C.; LEMOS, L.; RICCI, N.D.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; MARTINS, V.G.; BARTHOLOMEU, D.C.; NEGRÃO-CORRÊA, D.A.; CARNEIRO, C.M.; FUJIWARA, R.T. Hookworm products ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.17, n. 11, p. 2275-86, 2011. <https://doi.org/10.1002/ibd.21629>

CARVALHO, G.L.; MOREIRA, L.E.; PENA, J.L.; MARINHO, C.C.; BAHIA, M.T.; MACHADO-COELHO, G.L. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 80-84, 2012. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000100011>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Parasites - Strongyloides**. Atlanta, GA: Global Health, Division of Parasitic Diseases and

Malaria, 2019. Acesso em 25 de fevereiro de 2022. Disponível em:  
<https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/biology.html>

CHAMONE, M.; ATUNCAR, G.; DE MELO, A. The Prevalence of *Schistosoma mansoni* is affected by *Taenia* spp. and Soil-transmitted Helminths. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, v. 8, p. 7-12, 2020.  
<http://dx.doi.org/10.20431/2349-0365.0805002>

CHAN, M.S. The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. **Parasitology today** (Personal ed.), v. 13, n. 11, p. 438–443, 1997.  
[https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(97\)01144-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01144-7)

CHANKONGSIN, S.; WAMPFLER, R.; RUF, M.T.; ODERMATT, P.; MARTI, H.; NICKEL, B.; KEOLUANGKHOT, V.; NEUMAYR, A. *Strongyloides stercoralis* prevalence and diagnostics in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 133, 2020.  
<https://doi.org/10.1186/s40249-020-00750-y>.

CHAVES, L.A.; GONÇALVES, A.L.; PAULA, F.M.; SILVA, N.M.; SILVA, C.V.; COSTA-CRUZ, J.M.; FREITAS, M.A. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for evaluation of fecal samples of immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 142, n. 14, p. 1715–1721, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001298>

CHECKLEY, A.M.; CHIODINI, P.L.; DOCKRELL, D.H.; BATES, I.; THWAITES, G.E.; BOOTH, H.L.; BROWN, M.; WRIGHT, S.G.; GRANT, A.D.; MABEY, D.C.; WHITTY, C.J.; SANDERSON, F.; BRITISH INFECTION SOCIETY AND HOSPITAL FOR TROPICAL DISEASES. Eosinophilia in returning travellers and migrants from the tropics: UK recommendations for investigation and initial management. **The Journal of Infection**, v. 60, n. 1, p. 1–20, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.11.003>.

CONCHA, R.; HARRINGTON, W.J.R.; ROGERS, A.I. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 203-211, 2005.  
<https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000152779.68900.33>

CONWAY, D.J.; BAILEY J.W.; LINDO, J.F.; ROBINSON, R.D.; BUNDY, D.A.; BIANCO SOURCE, A.E. SerumIgG Reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa Larval Proteins of *Strongyloides stercoralis* in Individuals with Strongyloidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 784-787, 1993.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/168.3.784>

COPELOVITCH, L.; SAM O.L.O.; TARAQUINIO, S.; CHANPHEAKTRA, N. Childhood nephrotic syndrome in Cambodia: an association with gastrointestinal parasites. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 1, p. 76–81, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.06.049>

CORRAL, M.A.; DE PAULA, F.M.; MEISEL, D.M.C.L.; ABDALA, E.; FIGUEIREDO COSTA, S.; CAMERA PIERROTTI, L.; YAMASHIRO, J.; DO NASCIMENTO GONÇALVES, E.M.; CASTILHO, V.L.P.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C.B. IgG

reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients. **Acta Tropica**, v. 190, p. 357-360, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.020>

CORRAL, M.A.; PAULA, F.M.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D.M.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 77–80, 2015c. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100011>.

CORRAL, M.A.; PAULA, F.M.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D.M.; CASTILHO, V.L.; GONÇALVES, E.M.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C. Immunodiagnosis of human strongyloidiasis: use of six different antigenic fractions from *Strongyloides venezuelensis* parasitic females. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 427–430, 2015a. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500010>

CORRAL, M.A.; PAULA, F.M.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D.M.; CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 77–80, 2015b. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100011>

CORRÊA, L.Q.; DO COUTO, B.P.; DE CARVALHO, E.F.G.; DE SOUSA, J.E.N.; DA SILVA RIBEIRO, V.; GONZAGA, H.T.; COSTA-CRUZ, J.M. Route of dexamethasone administration influences parasite burden in *Strongyloides* hyperinfection model. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 47, n. 3, p.520-526, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12639-023-01595-6>.

COSTA, I.N.; SOPELETE, M.C.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; COSTA-CRUZ, J.M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v. 48, p. 306e311, 2003.

COSTA-CRUZ, J.M. ***Strongyloides stercoralis***. In: NEVES, D.P. (Org.). *Parasitologia Humana*, Atheneu, São Paulo, 2003. p. 247-256.

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

COSTA-CRUZ, J.M.; BULLAMAH, C.B.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; CAMPOS, D.M.B.; VIEIRA, M.A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 23-31, 1997. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651997000600001>

CUNHA, R.A.; DE CARVALHO, E.F.G.; DE SOUSA, J.E.N.; COSTA-CRUZ, J.M. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 671-6, 2017.

DA SILVA, H.; DE CARVALHO, C.J.; LEVENHAGEN, M.A.; COSTA-CRUZ, J.M. The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals. **Parasitology International**, v. 63, n. 6, p. 790–793, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.005>

DACAL, E.; KÖSTER, P.C.; CARMENA, D. Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 38, n. 1, p. 24–31, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.005>

DAGMAWI, P.; MEKONNEN, A.; ABEBE, F.; BERHANU, M. Prevalence of gastrointestinal helminthes among dogs and owners' perception about zoonotic dog parasites in Hawassa Town, Ethiopia. **Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 4, n. 8, p. 205-209, 2012. <https://doi.org/10.5897/JPHE12.022>

DE SOUZA, J.N.; CRUZ, A.; ARAÚJO, W.; SAMPAIO, L.M.; ALLEGRETTI, S.M.; TEIXEIRA, M.; HANDALI, S.; GALVÃO-CASTRO, B.; SOARES, N.M. Alcohol consumption alters anti-*Strongyloides stercoralis* antibodies production. **Immunobiology**, v. 225, n. 2, p. 151898, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.151898>.

DONG, M.D.; KARSENTI, N.; LAU, R.; RALEVSKI, F.; CHEEMA, K.; BURTON, L.; KLOWAK, M.; BOGGILD, A.K. Strongyloidiasis in Ontario: Performance of diagnostic tests over a 14-month period. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 6, p. 625–629, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.10.011>.

EAMUDOMKARN, C.; SITHITHAWORN, P.; KAMAMIA, C.; YAKOVLEVA, A.; SITHITHAWORN, J.; KAEWKES, S.; TECHASEN, A.; LOILOME, W.; YONGVANIT, P.; WANGBOON, C.; SAICHUA, P.; ITOH, M.; M BETHONY, J. Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. **PloS One**, v. 13, n. 7, p. e0192598, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192598>.

EAMUDOMKARN, C.; SITHITHAWORN, P.; SITHITHAWORN, J.; KAEWKES, S.; SRIPA, B.; ITOH, M. Comparative evaluation of *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larval antigen for diagnosis of strongyloidiasis in an endemic area of opisthorchiasis. **Parasitology Research**, v. 114, n. 7, p. 2543–2551, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4458-3>.

EL-MALKY, M.; MARUYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y.; SHIMADA, S.; YOSHIDA, A.; AMANO, T.; TOMINAGA, A.; TAKATSU, K.; OHTA, N. Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Parasitology International**, v. 52, n. 1, p. 71–79, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(02\)00086-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(02)00086-7).

EL-MALKY, M.A.; MARUYAMA, H.; AL-HARTHI, S.A.; EL-BESHBISHI, S.N.; OHTA, N. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. **Parasites & Vectors**, v. 24, n. 6, p. 148, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-148>

ESCHENAZI, P.D. 2013. O papel do linfócito B na resposta imune protetora induzida pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2013.

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J.L.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review. **The Journal of Infection**, v. 54, n. 1, p. 18–27, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.016>.

FAVERO, V.; FRASCA CANDIDO, RR.; DE MARCO VERISSIMO, C.; JONES, M.K.; ST PIERRE, T.G.; LINDHOLZ, C.G.; DA SILVA, V.D.; MORASSUTTI, A.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Optimization of the Helmintex method for schistosomiasis diagnosis. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 28-34, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.001>

FELICIANO, N.D.; GONZAGA, H.T.; GONÇALVES-PIRES, M.; GONÇALVES, A.L.; RODRIGUES, R.M.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 2, p. 153–161, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.01.012>.

FERNANDES, A.; PEREIRA, A.T.; ESCHENAZI, P.D.; SCHILTER, H.C.; SOUSA, A.L.; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 3, p. 139-149, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.01009.x>

FERNÁNDEZ-SOTO, P.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, A.; GANDASEGUI, J.; BAJO SANTOS, C.; LÓPEZ-ABÁN, J.; SAUGAR, J.M.; RODRÍGUEZ, E.; VICENTE, B.; MURO, A. Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. e0004836, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004836>.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A.; MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W.C.; URBAN, J.F. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 505-533, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.505>

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S.C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K.B.; SCHOPF, L.; URBAN, J.F. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 139–155, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00192.x>

FONSECA, P.; CORRAL, M.A.; MEISEL, D.; LEVI, D.; NASCIMENTO, R.C.; CASTRO-BORGES, W.; GRYSCHKEK, R.; COSTA-CRUZ, J. M.; PAULA, F.M. Immunoreactivity of proteins within 30-40 kDa range during the acute and the

recovery phases in rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. e23, 2020. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062023>.

FORMENTI, F.; LA MARCA, G.; PERANDIN, F.; PAJOLA, B.; ROMANO, M.; SANTUCCI, B.; SILVA, R.; GIORLI, G.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D. A diagnostic study comparing conventional and real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* on urine and on faecal samples. **Acta Tropica**, v. 190, p. 284–287, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.001>.

FORRER, A.; KHIEU, V.; SCHÄR, F.; HATTENDORF, J.; MARTI, H.; NEUMAYR, A.; CHAR, M.C.; HATZ, C.; MUTH, S.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis* is associated with significant morbidity in rural Cambodia, including stunting in children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005685, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005685>

FRADEJAS, I.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; LIZASOÁIN, M.; RODRÍGUEZ DE LAS PARRAS, E.; PÉREZ-AYALA, A. Comparative study of two commercial tests for *Strongyloides stercoralis* serologic diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 12, p. 561–567, 2018. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try101>

FREEDMAN, D.O. Experimental infection of human subject with *Strongyloides* species. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1221-6, 1991. <https://doi.org/10.1093/clinids/13.6.1221>

FRIEDENBERG, F.; WONGPRAPARUT, N.; FISCHER, R.A.; GUBERNICK, J.; ZAERI, N.; EIGER, G.; OZDEN, Z. Duodenal obstruction caused by *Strongyloides stercoralis* enteritis in an HTLV-1-infected host. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 44, n. 6, p. 1184–1188, 1999. <https://doi.org/10.1023/a:1026636509713>

GALIOTO, A.M.; HESS, J.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; LEE, J.J.; ABRAHAM, D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5730–5738, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.01958-05>

GAUS, B.; TOBERER, F.; KAPAUN, A.; HARTMANN, M. Chronische *Strongyloides-stercoralis*-Infektion. Larva currens als Hautmanifestation [Chronic *Strongyloides stercoralis* infection. Larva currens as skin manifestation]. **Der Hautarzt, Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 62, n. 5, p. 380–383, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00105-010-2056-y>

GELAYE, W.; WILLIAMS, N.A.; KEPHA, S.; JUNIOR, A.M.; FLEITAS, P.E.; MARTI-SOLER, H.; DAMTIE, D.; MENKIR, S.; KROLEWIECKI, A.J.; VAN LIESHOUT, L.; ENBIALE, W. Performance evaluation of Baermann techniques: The quest for developing a microscopy reference standard for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, p. e0009076, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009076>

GENTA, R.M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 755–767, 1989. <https://doi.org/10.1093/clinids/11.5.755>

GENTA, R.M.; FREI, D.F.; LINKE, M.J. Demonstration and partial characterization of parasite-specific immunoglobulin A responses in human strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1505e1510, 1987. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.8.1505-1510.1987>

GOULART DE CARVALHO, E.F.; NETO DE SOUSA, J.E.; GONÇALVES, A.L.; DA CUNHA-JUNIOR, J.P.; COSTA-CRUZ, J.M. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* larvae, parthenogenetic females or eggs extracts for the diagnosis of experimentally infected immunosuppressed rats. **Experimental parasitology**, v. 157, p. 117–123, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.07.009>

GONÇALVES, A.L.; DE ARAÚJO, K.C.; CARVALHO, E.F.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. Specific IgG and immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode *Strongyloides venezuelensis* for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 3, p. 342–346, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000346>

GONÇALVES, A.L.; ROCHA, C.A.; GONZAGA, H.T.; GONÇALVES-PIRES, M.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, n. 1, p. 79–84, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.011>

GONÇALVES, A.L.; RIBEIRO, T.S.; SILVA, C.V.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. A novel approach based on antigen, antibody and immune complex detection in bronchoalveolar lavage fluid samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta Tropica**. v. 124. p. 166– 169, 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.010>

GONÇALVES, A.L.R.; SILVA, C.V.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**. v. 125. p. 338-341, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.02.015>

GONZAGA, H.T.; RIBEIRO, V.S.; FELICIANO, N.D.; MANHANI, M.N.; SILVA, D.A.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. **Immunology Letters**, v. 139, n. 1-2, p. 87–92, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.05.006>.

GOUNNI, A.S.; LAMKHIOUED, B.; OCHIAI, K.; TANAKA, Y.; DELAPORTE, E.; CAPRON, A.; KINET, J.P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. **Nature**, v. 367, n. 6459, p. 183–186, 1994. <https://doi.org/10.1038/367183a0>

GRI, G.; FROSSI, B.; D'INCA, F.; DANELLI, L.; BETTO, E.; MION, F.; SIBILANO, R.; PUCILLO, C. Mast cell: an emerging partner in immune interaction. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 120, 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00120>

GROVE, D.I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-309, 1996. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60036-6)

GROVE, D.I.; NORTHERN, C. Dissociation of the protective immune response in the mouse to *Strongyloides ratti*. **Journal of Helminthology**, v. 63, n. 4, p. 307–314, 1989. <https://doi.org/10.1017/s0022149x00009202>

GULBAS, Z.; KEBAPCI, M.; PASAOGLU, O.; VARDARELI, E. Successful ivermectin treatment of hepatic strongyloidiasis presenting with severe eosinophilia. **Southern Medical Journal**, v. 97, n. 9, p. 907–910, 2004. <https://doi.org/10.1097/01.SMJ.0000139936.20116.A7>

HAILU, T.; AMOR, A.; NIBRET, E.; MUNSHEA, A.; ANEGAGRIE, M.; FLORES-CHAVEZ, M.D.; TANG, T.T.; SAUGAR, J.M.; BENITO, A. Evaluation of five diagnostic methods for *Strongyloides stercoralis* infection in Amhara National Regional State, northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 297, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07299-1>

HAILU, T.; NIBRET, E.; AMOR, A.; & MUNSHEA, A. *Strongyloides stercoralis* Infection in Ethiopia: Systematic Review and Meta-analysis on Prevalence and Diagnostic Methods. **Helminthologia**, v. 58, n. 1, p. 17–27, 2021. <https://doi.org/10.2478/helm-2021-0010>

HAILU, T.; NIBRET, E.; AMOR, A.; & MUNSHEA, A. Strongyloidiasis in Africa: Systematic Review and Meta-Analysis on Prevalence, Diagnostic Methods, and Study Settings. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 2868564, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2868564>

HARADA, U.; MORI, O.A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medica**, v. 1, p. 177-9, 1955.

HARVEY, S.C.; VINEY, M.E. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Genetics**, v. 158, n. 4, p. 1527–1533, 2001. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.4.1527>.

HASEGAWA, H.; ORIDO, Y.; SATO, Y.; OTSURU, M. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 37, p. 429-434, 1988.

HENRIQUEZ-CAMACHO, C.; GOTUZZO, E.; ECHEVARRIA, J.; WHITE, A.C.; TERASHIMA, A.; SAMALVIDES, F.; PÉREZ-MOLINA, J.A.; PLANA, M.N. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2016, n. 1, p. CD007745, 2016. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007745.pub3>



HERBERT, D.R.; LEE, J.J.; LEE, N.A.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 4544-4551, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4544>

HERBERT, D.R.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 2, p. 95–101, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00441.x>

HINDY, P.; PARVIN, R.; HANNA, K.; GRESS, F. Strongyloidiasis presenting as duodenal obstruction in a patient infected with human T-cell lymphotropic virus type 1. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 74, n. 2, p. 439–441, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2010.11.035>

HINO, A.; TANAKA, T.; TAKAISHI, M.; FUJII, Y.; PALOMARES-RIUS, J.E.; HASEGAWA, K.; MARUYAMA, H.; KIKUCHI, T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 141, p. 1736–1745, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001036>

HO, R.J.; GIBALDI, M. 2003. **Antibodies and Derivatives**. (eds: HO, R.J.; GIBALDI, M., editors. *Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming Proteins and Genes into Drugs*). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2003. p.271–311.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in Schistosomiasis mansoni. **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 283-291.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300>

HUANG, L.; APPLETON, J.A. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 798-807, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.004>

HUGGINS, D. Estrongiloidíase grave: relato de um caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 5, n. 3, p. 159-174, 1971. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821971000300006>

HUNT, V.L.; TSAI, I.J.; COGHLAN, A.; REID, A.J.; HOLROYD, N.; FOTH, B.J.; TRACEY, A.; COTTON, J.A.; STANLEY, E.J.; BEASLEY, H.; BENNETT, H.M.; BROOKS, K.; HARSHA, B.; KAJITANI, R.; KULKARNI, A.; HARBECKE, D.; NAGAYASU, E.; NICHOL, S.; OGURA, Y.; QUAIL, M.A.; RANDLE, N.; XIA, D.; BRATTIG, N.W.; SOBLIK, H.; RIBEIRO, D.M.; SANCHEZ-FLORES, A.; HAYASHI, T.; ITOH, T.; DENVER, D.R.; GRANT, W.; STOLTZFUS, J.D.; LOK, J.B.; MURAYAMA, H.; WASTLING, J.; STREIT, A.; KIKUCHI, T.; VINEY, M.; BERRIMAN, M. The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. **Nature Genetics**, v. 48, p. 299–307, 2016. <https://doi.org/10.1038/ng.3495>

INCANI, R.N.; FERRER, E.; HOEK, D.; RAMAK, R.; ROELFSEMA, J.; MUGHINI-GRAS, L.; KORTBEEK, T.; PINELLI, E. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. **Acta Tropica**, v. 167, p. 64–70, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.014>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS – IBGE (2010).

**População: Maceió** - Análise sobre a população dos maiores bairros de Maceió básico. Disponível em: <[https://populacao.net.br/os-maiores-bairros-maceio\\_al.html](https://populacao.net.br/os-maiores-bairros-maceio_al.html)>. Acesso em: 02 out 2022.

IRIEMENAM, N.C.; SANYAOLU, A.O.; OYIBO, W.A.; FAGBENRO-BEYIOKU, A.F. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. **Parasitology International**, v. 59, n. 1, p. 9–14, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.009>

ISHIKAWA, N.; SHI, B.B.; KHAN, A.I.; NAWA, Y. Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 11, p. 581–586, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1995.tb01001.x>

JALETA, T.G.; ZHOU, S.; BEMM, F.M.; SCHÄR, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; ODERMATT, P.; LOK, J.B.; STREIT, A. Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans-Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005752, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005752>.

JARRETT, E.E.; MILLER, H.R. Production and activities of IgE in helminth infection. **Progress in Allergy**, v. 31, p. 178-233, 1982.

JENKINS, S.J.; ALLEN, J.E. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 262609, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/262609>

JORGENSEN, T.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. Effectively controlling strongyloidiasis. **Parasitology Today**, v. 12, n. 4, p. 164, 1996. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80806-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80806-4)

JÚNIOR, A.F.; GONÇALVES-PIRES, M.R.; SILVA, D.A.; GONÇALVES, A.L.; COSTA-CRUZ, J.M. Parasitological and serological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in domesticated dogs from southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 136, n. 2, p. 137–145, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.022>

KAEWRAAT, W.; SENGTHONG, C.; YINGKLANG, M.; INTUYOD, K.; HAONON, O.; ONSURATHUM, S.; DANGTAKOT, R.; SAISUD, P.; SANGKA, A.; ANUTRAKULCHAI, S.; PINLAOR, S.; CHA'ON, U.; PINLAOR, P. Improved agar plate culture conditions for diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **Acta Tropica**, v. 203, p. 105291, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105291>

KALANTARI, N.; CHEHRAZI, M.; GHAFARI, S.; GORGANI-FIROUZJAEI, T. Serological assays for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 6, p. 459–469, 2020. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz135>

KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 3, p. 5, 1954.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KEISER, P.B.; NUTMAN, T.B. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 208–217, 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>

KETZIS, J.K. Limitations to the adoption of a standardized *Strongyloides stercoralis* diagnostic method: Case study in the Caribbean. **Acta Tropica**, v. 170, p. 178-183, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.003>

KHAN, A.I.; HORII, Y.; TIURIA, R.; SATO, Y.; NAWA, Y. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. **International Journal for Parasitology**, v. 23, n. 5, p. 551-555, 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(93\)90159-V](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(93)90159-V)

KIM, D.K.; JOO, K.H.; CHUNG, M.S. Changes of cytokine mRNA expression and IgG responses in rats infected with *Capillaria hepatica*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 95-102, 2007. <https://doi.org/10.3347/kjp.2007.45.2.95>

KIM, J.; JOO, H.S.; KIM, D.H.; LIM, H.; KANG, Y.H.; KIM, M.S. A case of gastric strongyloidiasis in a Korean patient. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 63-67, 2003. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.63>

KNOPP, S.; MGENI, A.F.; KHAMIS, I.S.; STEINMANN, P.; STOTHARD, J.R.; ROLLINSON, D.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. e331, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000331>

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 Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 4, p. 518–521, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.518>

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M.B. Evaluation of Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 20, p. 36-40, 2004.

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

KRAMME, S.; NISSEN, N.; SOBLIK, H.; ERTTMANN, K.; TANNICH, E.; FLEISCHER, B.; PANNING, M.; BRATTIG, N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 4, 454–458, 2011. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.025338-0>

KRISTANTI, H.; MEYANTI, F.; WIJAYANTI, M.A.; MAHENDRADHATA, Y.; POLMAN, K.; CHAPPUIS, F.; UTZINGER, J.; BECKER, S. L.; Murhandarwati, E. Diagnostic comparison of Baermann funnel, Koga agar plate culture and polymerase chain reaction for detection of human *Strongyloides stercoralis* infection in Maluku, Indonesia. **Parasitology Research**, v. 117, n. 10, p. 3229–3235, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6021-5>

KROLEWIECKI, A.; NUTMAN, TB. Strongyloidiasis: A Neglected Tropical Disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 135-151, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.006>

KROLEWIECKI, A.J.; KOUKOUNARI, A.; ROMANO, M.; CARO, R.N.; SCOTT, A.L.; FLEITAS, P.; CIMINO, R.; SHIFF, C.J. Transrenal DNA-based diagnosis of *Strongyloides stercoralis* (Grassi, 1879) infection: Bayesian latent class modeling of test accuracy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006550, 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006550>

KROLEWIECKI, A.J.; LAMMIE, P.; JACOBSON, J.; GABRIELLI, A.F.; LEVECKE, B.; SOCIAS, E.; ARIAS, L.M.; SOSA, N.; ABRAHAM, D.; CIMINO, R.; ECHAZÚ, A.; CRUDO, F.; VERCRUYSSE, J.; ALBONICO, M. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7, n.5, p. e2165, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002165>

KROLEWIECKI, A.J.; RAMANATHAN, R.; FINK, V.; MCAULIFFE, I.; CAJAL, S.P.; WON, K.; JUAREZ, M.; DI PAOLO, A.; TAPIA, L.; ACOSTA, N.; LEE, R.; LAMMIE, P.; ABRAHAM, D.; NUTMAN, T.B. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1624–1630, 2010. <https://doi.org/10.1128/CVI.00259-10>

KULKARNI, A.; DYKA, A.; NEMETSCHKE, L.; GRANT, W.N.; STREIT, A. *Parastrongyloides trichosuri* suggests that XX/XO sex determination is ancestral in Strongyloididae (Nematoda). **Parasitology**, v. 140, p. 1822–1830, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001315>

KUZUCU, A. Parasitic diseases of the respiratory tract. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 12, n. 3, p. 212–221, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.mcp.0000219271.80804.9e>

LAMPS, L.W. Infectious causes of appendicitis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 24, n. 4, p. 995–x, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.07.012>

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometrics**, v. 33, n. 2, p. 363-74, 1997.

LAU, C.C.; SAMALVIDES, C.F.; TERASHIMAIWASHITA, A. Evaluación de técnicas parasitológicas en el diagnóstico de estrogiloidiasis por *Strongyloides stercoralis*. **Revista Medica Herediana**, v. 16, p. 11-8, 2005. <http://dx.doi.org/10.20453/rmh.v16i1.858>

LAWRENCE, C.E. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? **Parasite Immunology**, v. 25, p. 271-281, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00630.x>

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

LIGAS, J.A.; KEREPESE, L.A.; GALIOTO, A.M.; LUSTIGMAN, S.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 12, p. 6835–6843, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6835-6843.2003>

LIM, S.; KATZ, K.; KRAJDEN, S.; FUKSA, M.; KEYSTONE, J.S.; KAIN, K.C. Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and management. **Canadian Medical Association Journal**, v. 171, n. 5, p. 479–484, 2004. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031698>

LINDO, J.F.; LEE, M.G. ***Strongyloides stercoralis* and *S. fulleborni*** (eds GILLESPIE, S.H.; PEARSON, R.D. - Principles and practice of clinical parasitology) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2001. 485 p.

LIU, A.B.; PU, Y.; ZHENG, Y.Q.; CAI, H.; YE, B. Therapeutic efficacies of chitosan against *Pneumocystis* pneumonia of immunosuppressed rat. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 7, p. 292–302, 2014. <https://doi.org/10.1111/pim.12117>

LLEWELLYN, S.; INPANKAEW, T.; NERY, S.V.; GRAY, D.J.; VERWEIJ, J.J.; CLEMENTS, A.C.; GOMES, S.J.; TRAUB, R.; MCCARTHY, J.S. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity Of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004380, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004380>

LÖSCHER, T.; SAATHOFF, E. Eosinophilia during intestinal infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, n. 3, p. 511-36, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2007.12.004>

LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S.Y.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H.R.; ANDERSON, L.M.; ANDREWS, K.G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L.M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D.H.; BELL, M.L.; BENJAMIN, E.J.; ... MEMISH, Z.A. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)

LUNA, B.O.; GRASSELLI, R.; ANANIAS, M.; PINTO, S.T.; BOZZA, A.F.; SOARES, M.; SALLUH, J.I.F. Estrongiloidíase Disseminada: Diagnóstico e Tratamento. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 463-68, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2007000400010>

MACHADO, E.R.; FACCIOLI, L.H.; COSTA-CRUZ, J.M.; LOURENÇO, E.V.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GONÇALVES-PIRES, M.; UETA, M.T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 7–14, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.008>

MACHADO, E.R.; UETA, M.T.; LOURENÇO, E.V.; ANIBAL, F.F.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; FACCIOLI, L.H. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, v. 29, p.549–557, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00974.x>

MACHICADO, J.D.; MARCOS, L.A.; TELLO, R.; CANALES, M.; TERASHIMA, A.; GOTUZZO, E. Diagnosis of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonic community of Peru using multiple diagnostic techniques. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 6, p. 333–339, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.004>

MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J. In defense of mucosal surfaces. Development of novel vaccines for IgA responses protective at the portals of entry of microbial pathogens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 4, n. 2, p. 315-341, 1990.

MAGNAVAL, J.F.; MANSUY, J.M.; VILLENEUVE, L.; CASSAING, S. A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Région Midi-Pyrénées (Southwestern France). **European Journal of Epidemiology**, v. 16, n. 2, p. 179–182, 2000. <https://doi.org/10.1023/a:1007632028471>

MANDONG, B.M.; MADAKI, A.J. Missed diagnosis of schistosomiasis leading to unnecessary surgical procedures in Jos University Teaching Hospital. **Tropical Doctor**, v. 32, n. 2, p. 96–97, 2005. <https://doi.org/10.1258/0049475054037011>.

MARCOS, L.A.; TERASHIMA, A.; CANALES, M.; GOTUZZO, E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 1, p. 35–46, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0150-z>

MARCOS, L.A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H.L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 314–318, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.020>

MARRA, N.M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G.C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S.F.; FRANÇA, T.G.; ISHIKAWA, L.L.; AMARANTE, A.F.; SARTORI, A.; AMARANTE, M.R. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 57-61, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000100008>

MARICHAL, T.; MESNIL, C.; BUREAU, F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. **Frontiers in Medicine**, v. 11, p. 4:101, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2017.00101>

MARUYAMA, H.; EL-MALKY, M.; KUMAGAI, T.; OHTA, N. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult worms in the host intestinal mucosa. **Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 165–171, 2003. <https://doi.org/10.1017/s0031182002002718>

MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Experimental Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 10–15, 1997. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.4100>

MARUYAMA, H.; NAWA, Y.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 16-20, 1998. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4268>

MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Immunology**, v. 164, n.7, p. 3749–3754, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3749>

MATSUMOTO, M.; SASAKI, Y.; YASUDA, K.; TAKAI, T.; MURAMATSU, M.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K. IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. **Infection and Immunity**, p. 81, n. 7, p. 2518–2527, 2013. <https://doi.org/10.1128/IAI.00285-13>

MCCARTY, T.R.; TURKELTAUB, J.A.; HOTEZ, P.J. Global progress towards eliminating gastrointestinal helminth infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 18–24, 2014. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000025>

MEJIA, R.; NUTMAN, T.B. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 458–463, 2012. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283551dbd>

MEJIA, R.; VICUÑA, Y.; BRONCANO, N.; SANDOVAL, C.; VACA, M.; CHICO, M.; COOPER, P.J.; NUTMAN, T.B. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 1041–1047, 2013. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0726>

MENDONÇA, J.C.; GAMA, L.A.; HAUSCHILDT, A.T.; CORÁ, L.A.; AMÉRICO, M.F. Gastrointestinal effects of ivermectin treatment in rats infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Acta Tropica**, v. 194, p. 69–77, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.024>

MENEZES, D.L.; SANTOS, C.T.J.; OLIVEIRA, Y.L.D.C.; CAMPOS, V.T.C.; NEGRÃO-CORRÊA, D.A.; GEIGER, S.M.; SILVA, J.R.S.; JAIN, S.; OLIVEIRA, L.M.; FUJIWARA, R.T.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; DOLABELLA, S.S. Accuracy study of Kato-Katz and Helmintex methods for diagnosis of Schistosomiasis mansoni in a moderate endemicity area in Sergipe, Northeastern Brazil. **Diagnostics**, v. 13, p. 527, 2023. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13030527>

MESTECKY, J.; RUSSELL, M.W. Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. **Immunology Letters**, v. 124, n. 2, p. 57-62, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.03.013>

MIGALOVICH-SHEIKHET, H.; FRIEDMAN, S.; MANKUTA, D.; LEVI-SCHAFFER, F. Novel identified receptors on mast cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 238, 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00238>

MILANI, A.M.R.; OLIVEIRA, R.S. Cooperativismo no bairro Vergel do Lago na Lagoa Mundaú –Maceió, Alagoas e a criação da cooperativa de trabalho das marisqueiras mulheres guerreiras (COOPMARIS). **Revista Pegada**, v. 22, n. 2, p. 263-280, 2021. <http://dx.doi.org/10.33026/peg.v22i2.8473>

MILDER, J.E.; WALZER, P.D.; KILGORE, G.; RUTHERFORD, I.; KLEIN, M. Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. **Gastroenterology**, v. 80, p. 1481-1488, 1981.

MIR, A.; BENAHMED, D.; IGUAL, R.; BORRAS, R.; O'CONNOR, J.E.; MORENO, M.J.; RULL, S. Eosinophil-selective mediators in human strongyloidiasis. **Parasite immunology**, v. 28, n. 8, p. 397-400, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00826.x>

MIRANDA, G.S.; RESENDE, S.D.; CARDOSO, D.T.; CAMELO, G.; SILVA, J.; DE CASTRO, V.N.; GEIGER, S.M.; CARNEIRO, M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Previous History of American Tegumentary Leishmaniasis Alters Susceptibility and Immune Response Against *Schistosoma mansoni* Infection in Humans. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 630934, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630934>

MOGHADDASSANI, H.; MIRHENDI, H.; HOSSEINI, M.; ROKNI, M. B.; MOWLAVI, G.H.; KIA, E. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection by PCR



detection of specific DNA in human stool samples. **Iranian Journal Parasitology**, v. 6, p.23-30, 2011.

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

MONTES, M.; SANCHEZ, C.; VERDONCK, K.; LAKE, J.E.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G.; TERASHIMA, A.; NOLAN, T.; LEWIS, D.E.; GOTUZZO, E.; WHITE, A.C. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 6, p. e456, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000456>

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 64, p. 507-624, 1948.

MOTA-FERREIRA, D.M.; GONÇALVES-PIRES, M.; JÚNIOR, A.F.; SOPELETE, M.C.; ABDALLAH, V.O.; COSTA-CRUZ, J.M. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 109, n. 2, p. 103–107, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.023>

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**, 7<sup>a</sup> ed., artmed, Porto Alegre, 2010. 885 p.

NAWA, Y.; KIYOTA, M.; KORENAGA, M.; KOTANI, M. Defective protective capacity of W/W<sup>v</sup> mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 4, p. 429–438, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1985.tb00088.x>

NEGRÃO-CORRÊA, D. Aspectos da biologia de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 e de *Strongyloides* sp. Isolados de roedores silvestres em infecções de camundongos Swiss. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 1990

NEGRÃO-CORRÊA, D.; PINHO, V.; SOUZA, D.G.; PEREIRA, A.T.; FERNANDES, A.; SCHEUERMANN, K.; SOUZA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 10-11, p. 1185–1195, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.05.005>

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1135-1142, 2004. <https://doi.org/10.1128/iai.72.2.1135-1142.2004>

NEMETSCHKE, L.; EBERHARDT, A.G.; HERTZBERG, H.; STREIT, A. Genetics, Chromatin Diminution, and Sex Chromosome Evolution in the Parasitic Nematode Genus *Strongyloides*. **Current Biology**, v. 20, n. 19, p. 1687–1696, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.014>

NONAKA, D.; TAKAKI, K.; TANAKA, M.; UMENO, M.; TAKEDA, T.; YOSHIDA, M.; HARAGUCHI, Y.; OKADA, K.; SAWAE, Y. Paralytic ileus due to strongyloidiasis: case report and review of the literature. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 4, p. 535–538, 1998. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.535>

NORSYAHIDA, A.; RIAZI, M.; SADJJADI, S.M.; MUHAMMAD HAFIZNUR, Y.; LOW, H.C.; ZEEHAIDA, M.; NOORDIN, R. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 5-6, p. 174–179, 2013. <https://doi.org/10.1111/pim.12029>

NUTMAN, T.B. Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 529–549, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2007.07.008>

O'CONNELL, E.M.; NUTMAN, T.B. Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 508–13, 2016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0266>

O'CONNELL, A.E.; HESS, J.A.; SANTIAGO, G.A.; NOLAN, T.J.; LOK, J.B.; LEE, J.J.; ABRAHAM, D. Major Basic Protein from Eosinophils and Myeloperoxidase from Neutrophils Are Required for Protective Immunity to *Strongyloides stercoralis* in Mice. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2770–2778, 2011. <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-10>

OLIVEIRA, R.; LIMA, J.; TEIXEIRA, M. M.; LAMBERTUCCI, J. R.; DE FIGUEIREDO ANTUNES, C. M.; CARNEIRO, M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Plasma levels of innate immune mediators are associated with liver fibrosis in low parasite burden *Schistosoma mansoni*-infected individuals. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 87, n. 3, p. 10.1111/sji.12642, 2018. <https://doi.org/10.1111/sji.12642>

OLSEN, A.; VAN LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.; STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J.J.; MAGNUSSEN, P. Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 10, p. 967–972, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.013>

OTTINO, L.; BUONFRATE, D.; PARADIES, P.; BISOFFI, Z.; ANTONELLI, A.; ROSSOLINI, G.M.; GABRIELLI, S.; BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Autochthonous Human and Canine *Strongyloides stercoralis* Infection in Europe: Report of a Human Case in An Italian Teen and Systematic Review of the Literature. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 439, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060439>

PADIGEL, U.M.; STEIN, L.; REDDING, K.; LEE, J.J.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; BIRNBAUMER, L.; ABRAHAM, D. Signaling through Galphai2 protein is required for recruitment of neutrophils for antibody-mediated elimination of larval *Strongyloides*

*stercoralis* in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 4, p. 1120–1126, 2007b. <https://doi.org/10.1189/jlb.1106695>

PADIGEL, U.M.; HESS, J.A.; LEE, J.J.; LOK, J.B.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 12, p. 1844-1851, 2007a. <https://doi.org/10.1086/522968>

PADIGEL, U.M.; LEE, J.J.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3232-3238, 2006. <https://doi.org/10.1128/iai.02067-05>

PAGE, W.; SPEARE, R. Chronic strongyloidiasis- Don't look and you won't find. **Australian Family Physician**, v. 45, n. 1, p. 40-44, 2016

PAK, B.J.; VASQUEZ-CAMARGO, F.; KALINICHENKO, E.; CHIODINI, P.L.; NUTMAN, T.B.; TANOWITZ, H.B.; MCAULIFFE, I.; WILKINS, P.; SMITH, P.T.; WARD, B.J.; LIBMAN, M.D.; NDAO, M. Development of a rapid serological assay for the diagnosis of strongyloidiasis using a novel diffraction-based biosensor technology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3002, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003002>

PALMER, C.S.; THOMPSON, R.C.; TRAUB, R.J.; REES, R.; ROBERTSON, I.D. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 181–190, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.015>

PARADIES, P.; DIGIARO, S.; COLELLA, A.; GRECO, B.; RECCHIA, A.; PRATO, M.G.; MAZZI, C.; LOSURDO, G.; DI LEO, A.; FORMENTI, F.; BUONFRATE, D. Strongyloidiasis in humans and dogs in Southern Italy: an observational study. **Parasitology Research**, v. 122, n. 12, p. 2885-2890, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07978-1>.

PAULA, F.M.; MALTA, F.; MARQUES, P.D.; SITTA, R.B.; PINHO, J.R.; GRYSCHKEK, R.C.; CHIEFFI, P.P. Molecular diagnosis of strongyloidiasis in tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 272–274, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140371>

PAULA, F.M.; COSTA-CRUZ, J.M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, v. 138, p. 1331-1340, 2011. <https://doi.org/10.1017/s003118201100120x>

PEREIRA, A.T.M. Papel de eosinófilos no desenvolvimento de proteção, na imunopatologia e nas alterações funcionais induzidas pela infecção por *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (1934), em camundongos Balb/c. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2008.

PEREIRA, C.E.M. Mechanic contensor for rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, p. 271-273, 2001. [10.1590/S0102-86502001000400015](https://doi.org/10.1590/S0102-86502001000400015).

PICHARD, D.C.; HENSLEY, J.R.; WILLIAMS, E.; APOLO, A.B.; KLION, A.D.; DIGIOVANNA, J.J. Rapid development of migratory, linear, and serpiginous lesions in association with immunosuppression. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 6, p. 1130–1134, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.11.036>

POCATERRA, L.A.; FERRARA, G.; PEÑARANDA, R.; ROJAS, E.; PÉREZ-CHACÓN, G.; HERNÁN, A.; CERTAD, G.; GOLDSTEIN, C.; NÚÑEZ, L. Improved Detection of *Strongyloides stercoralis* in Modified Agar Plate Cultures. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 4, p. 863–865, 2017. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0414>

PORTO, A.F.; NEVA, F.A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCÂNTARA, L.; CARVALHO, E.M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 9, p. 503–507, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00407.x>

PORTO, M.A.; ALCÂNTARA, L.M.; LEAL, M.; CASTRO, N.; CARVALHO, E.M. Atypical clinical presentation of strongyloidiasis in a patient co-infected with human T cell lymphotropic virus type I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 124–125, 2005.

PRENDKI, V.; FENAUX, P.; DURAND, R.; THELLIER, M.; BOUCHAUD, O. Strongyloidiasis in man 75 years after initial exposure. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 931–932, 2011. <https://doi.org/10.3201/eid1705.100490>

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

RAJAMANICKAM, A.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; DOLLA, C.K.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Elevated Systemic Levels of Eosinophil, Neutrophil, and Mast Cell Granular Proteins in *Strongyloides stercoralis* Infection that Diminish following Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 207, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00207>

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R.W.; GAM, A.A.; NEVA, F.A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 196-203, 1998. <https://doi.org/10.1086/513817>

RAMANATHAN, R.; BURBELO, P.D.; GROOT, S.; IADAROLA, M.J.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 3, p. 444–451, 2008. <https://doi.org/10.1086/589718>

RAMANATHAN, R.; NUTMAN, T. *Strongyloides stercoralis* Infection in the Immunocompromised Host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 10, p. 105-10, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11908-008-0019-6>

RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R.W.; ANDERSEN, J.F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 73–81, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00214-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00214-1)

REITZ, M.; BRUNN, M.L.; RODEWALD, H.R.; FEYERABEND, T.B.; ROERS, A.; DUDECK, A.; VOEHRINGER, D.; JÖNSSON, F.; KÜHL, A.A.; BRELOER, M. Mucosal mast cells are indispensable for the timely termination of *Strongyloides ratti* infection. **Mucosal Immunology**, v. 10, p. 481-492, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2016.56>

REQUENA-MÉNDEZ, A.; CHIODINI, P.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; GOTUZZO, E.; MUÑOZ, J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e2002, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002002>

REQUENA-MENDEZ, A.; BUONFRATE, D.; BISOFFI, Z.; GUTIERREZ, J.M. Advances in the Diagnosis of Human Strongyloidiasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, p. 207–215, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0034-7>

RESENDE, S.D.; MAGALHÃES, F.C.; RODRIGUES-OLIVEIRA, J.L.; CASTRO, V.N.; SOUZA, C.; OLIVEIRA, E.J.; CARNEIRO, M.; GEIGER, S.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D.A. Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF- $\alpha$  and High Levels of IL-10 in Serum. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3158, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03158>

RIBEIRO, V.S.; FELICIANO, N.D.; GONZAGA, H.T.; COSTA, I.N.; GONÇALVES-PIRES, M.R.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology Letters**, v. 134, n. 1, p. 69–74, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.08.011>

RICHTER, J.; MÜLLER-STÖVER, I.; STROTHMEYER, H.; GÖBELS, K.; SCHMITT, M.; HÄUSSINGER, D. Arthritis associated with *Strongyloides stercoralis* infection in HLA B-27-positive African. **Parasitology Research**, v. 99, n. 6, p. 706–707, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0225-9>

RIGGIO, F.; MANNELLA, R.; ARITI, G.; PERRUCCI, S. Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 78–84, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.026>

RIGO, C.R.; LESCANO, S.Z.; MARCHI, C.R.; AMATO NETO, V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 648-53, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000600017>

RODRIGUES, J.G.M.; ALBUQUERQUE, P.S.V.; NASCIMENTO, J.R.; CAMPOS, J.A.V.; GODINHO, A.S.S.; ARAÚJO, S.J.; BRITO, J.M.; JESUS, C.M.; MIRANDA, G.S.; REZENDE, M.C.; NEGRÃO-CORRÊA, D.A.; ROCHA, C.Q.; SILVA, L.A.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113287, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113287>

RODRIGUES, R.M.; DE OLIVEIRA, M.C.; SOPELETE, M.C.; SILVA, D.A.; CAMPOS, D.M.; TAKETOMI, E.A.; COSTA-CRUZ, J.M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1209–1214, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0602-z>

ROUFOSSE, F.E.; GOLDMAN, M.; COGAN, E. Hypereosinophilic syndromes. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, p. 2-37, 2007. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-37>

ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 147–174, 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>

ROTMAN, H.L.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; BRIGANDI, R.A.; LEON, O.; GLEICH, G.J.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. **Experimental Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 267–278, 1996. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0034>

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

SALAS-CORONAS, J.; CABEZAS-FERNÁNDEZ, M.T.; LOZANO-SERRANO, A.B.; SORIANO-PÉREZ, M.J.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, J.; CUENCA-GÓMEZ, J. Á. Newly Arrived African Migrants to Spain: Epidemiology and Burden of Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 319–325, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0604>

SALVADOR, F.; MOLINA, I.; SULLEIRO, E.; BURGOS, J.; CURRAN, A.; VAN DEN EYNDE, E.; VILLAR DEL SAZ, S.; NAVARRO, J.; CRESPO, M.; OCAÑA, I.; RIBERA, E.; FALCÓ, V.; PAHISSA, A. Tropical diseases screening in immigrant patients with human immunodeficiency virus infection in Spain. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 1196–1202, 2013. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0714>

SALVADOR, F.; SULLEIRO, E.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; SAUGAR, J.M.; RODRÍGUEZ, E.; PAHISSA, A.; MOLINA, I. Usefulness of *Strongyloides stercoralis*

serology in the management of patients with eosinophilia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 830–834, 2014.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0678>

SASAKI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MARUYAMA, H.; TEGOSHI, T.; OHTA, N.; ARIZONO, N.; NAKANISHI, K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cells-dependent type 2 innate immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 607-616, 2005.

<https://doi.org/10.1084/jem.20042202>

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

SATOH, M.; TOMA, H.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y.; KOKAZE, A.; SATO, Y. Association of a sex-related difference of *Strongyloides stercoralis*-specific IgG4 antibody titer with the efficacy of treatment of strongyloidiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 107–111, 2004.

SATOH, M.; TOMA, H.; SATO, Y.; KIKUCHI, M.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y.; KIYUNA, S.; HIRAYAMA, K. Production of a high level of specific IgG4 antibody associated with resistance to albendazole treatment in HLA-DRB1\*0901-positive patients with strongyloidiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 4, p. 668–671, 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.668>

SEYBOLT, L.M.; CHRISTIANSEN, D.; BARNETT, E.D. Diagnostic evaluation of newly arrived asymptomatic refugees with eosinophilia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 3, p. 363-7, 2006. <https://doi.org/10.1086/499238>

SCHAD, G.A.; AIKENS, L.M.; SMITH, G. *Strongyloides stercoralis*: is there a canonical migratory route through the host? **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 740-749, 1989.

SCHÄR, F.; ODERMATT, P.; KHIEU, V.; PANNING, M.; DUONG, S.; MUTH, S.; MARTI, H.; KRAMME, S. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. **Acta Tropica**, v. 126, n. 2, p. 89–92, 2013b.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.012>

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2288, 2013a.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

SCHÄR, F.; HATTENDORF, J.; KHIEU, V.; MUTH, S.; CHAR, M.C.; MARTI, H. P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis* larvae excretion patterns before and after treatment. **Parasitology**, v. 141, p. 892-897, 2014.

<https://doi.org/10.1017/S0031182013002345>

SCHILTER, H.C.; PEREIRA, A.T.; ESCHENAZI, P.D.; FERNANDES, A.; SHIM, D.; SOUSA, A.L.; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 3, p. 184–192, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01176.x>

SCHMIDT, G.D.; ROBERTS, L.S. **Foundations of Parasitology**. 8<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 2009. 701 p.

SCHWARTZ, L.B. **The molecular and cell biology of mast cells and basophils**. In: LEVINSON, A.I.; PATERSON, Y. Molecular and cellular Biology of the allergic response. CRC Press, Florida, 1994. 281-330 p.

SEGARRA-NEWNHAM, M. Manifestations, diagnosis and treatment of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, n. 12, p. 1992-2001, 2007. <https://doi.org/10.1345/aph.1K302>

SEN, P.; GIL, C.; ESTRELLAS, B.; MIDDLETON, J.R. Corticosteroid-induced asthma: a manifestation of limited hyperinfection syndrome due to *Strongyloides stercoralis*. **Southern Medical Journal**, v. 88, n. 9, p. 923–927, 1995.

SHARIFDINI, M.; MIRHENDI, H.; ASHRAFI, K.; HOSSEINI, M.; MOHEBALI, M.; KHODADADI, H.; KIA, E.B. Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Parasitological Methods for Detection of *Strongyloides stercoralis* in Human Fecal Samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1285–1291, 2015. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0309>

SHIELD, J.M.; KOW, F. A comparative study of intestinal helminths in pre-school-age urban and rural children in Morobe Province, Papua New Guinea. **Papua and New Guinea Medical Journal**, v. 56, n. 1-2, p. 14–31, 2013.

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

SIDDIQUI, A.A.; BERK, S.L. Strongyloidiasis. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 5, n. 283-289, 2003.

SIEGEL, M.O.; SIMON, G.L. Is human immunodeficiency virus infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. e1581, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001581>

SILVA, L.P.; BARCELOS, I.S.; PASSOS-LIMA, A.B.; ESPINDOLA, F.S.; CAMPOS, D.M.; COSTA-CRUZ, J.M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 687–691, 2003. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000500017>



SILVEIRA, M.R.; NUNES, K.P.; CARA, D.C.; SOUZA, D.G.; CORRÊA, A.; TEIXEIRA, M.M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6263–6272, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6263-6272.2002>

SPEARE, R. **Identification of species of *Strongyloides***, in: TAYLOR, F. (Eds.), *Strongyloidiasis a Major Roundworm Infection of Man*. D.I. Grove, London, 1989. 11–84 p.

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

STREIT, A. Genetics: modes of reproduction and genetic analysis. **Parasitology**, v.144, n. 3, p.316-326, 2017. <https://doi.org/10.1017/s0031182016000342>

STREIT, A. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. **Parasitology**, v. 135, p. 285–294, 2008. <https://doi.org/10.1017/S003118200700399X>

STREIT, A.; WANG, J.; KANG, Y.; DAVIS, R. E. Gene silencing and sex determination by programmed DNA elimination in parasitic nematodes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 120–127, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.012>

SUDRÉ, A.P.; SIQUEIRA, R.C.; BARRETO, M.G.; PERALTA, R.H.; MACEDO, H.W.; PERALTA, J. M. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 1117–1123, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0596-6>

SULTANA, Y.; JEOFFREYS, N.; WATTS, M.R.; GILBERT, G.L.; LEE, R. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 1048–1051, 2013. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0437>

TAIRA, N.; NAKAMURA, Y.; ALMEIDA, M. O.; SAEKI, H. Massive experimental infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats and absence of sudden death. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 57. p. 855-858, 1995. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.855>

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 8, v. 907–911, 1995. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00014-s](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00014-s)

TAMANO, L.T.O.; ARAUJO, D.M.; LIMA, B.B.C.; SILVA, F.N.F.; SILVA, J. Socioeconomia e saúde dos pescadores de *Mytella falcata* da Lagoa Mundaú, Maceió-AL. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi de Ciências Humanas**, v. 10, n. 3, p. 699-710, 2015. <https://doi.org/10.1590/1981-81222015000300011>

TAMAROZZI, F.; LONGONI, S.S.; MAZZI, C.; PETTENE, S.; MONTRESOR, A.; MAHANTY, S.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D. Diagnostic accuracy of a novel enzyme-linked immunoassay for the detection of IgG and IgG4 against *Strongyloides stercoralis* based on the recombinant antigens NIE/SsIR. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 412. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04916-x>

TAMAROZZI, F.; LONGONI, S.S.; MAZZI, C.; PETTENE, S.; MONTRESOR, A.; MAHANTY, S.; BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D. Diagnostic accuracy of a novel enzyme-linked immunoassay for the detection of IgG and IgG4 against *Strongyloides stercoralis* based on the recombinant antigens NIE/SsIR. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 412, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04916-x>

TEIXEIRA, C.F.; NEUHAUSS, E.; BEN, R.; ROMANZINI, J.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **Plos Neglected Tropical Diseases**, vol. 1, n. 2, p. e73, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000073>

TEIXEIRA, M.C.A.; PACHECO, F.T.F.; SOUZA, J.N.; SILVA, M.L.S.; INÊS, E.J.; SOARES, N.M. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. **BioMed Research International**, v. 2016, 11 p., 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4872473>

TELLO, R.; TERASHIMA, A.; MARCOS, L.A.; MACHICADO, J.; CANALES, M.; GOTUZZO, E. Highly effective and inexpensive parasitological technique for diagnosis of intestinal parasites in developing countries: spontaneous sedimentation technique in tube. *International journal of infectious diseases*. **International Society for Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. e414–e416, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.12.017>

TEN HOVE, R.J.; VAN ESBROECK, M.; VERVOORT, T.; VAN DEN ENDE, J.; VAN LIESHOUT, L.; VERWEIJ, J.J. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travelers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 28, n. 9, p. 1045-1053, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0745-1>

THAMSBORG, S.M.; KETZIS, J.; HORII, Y.; MATTHEWS, J.B. *Strongyloides* spp. infections of veterinary importance. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 274–284, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001116>

THANCHOMNANG, T.; INTAPAN, P.M.; SANPOOL, O.; RODPAI, R.; TOURTIP, S.; YAHOM, S.; KULLAWAT, J.; RADOMYOS, P.; THAMMASIRI, C.; MALEEWONG, W. First molecular identification and genetic diversity of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* in human communities having contact with long-tailed macaques in Thailand. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1917-1923, 2017. doi: 10.1007/s00436-017-5469-z. Epub 2017 May 12. PMID: 28500375. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5469-z>

THWAITES, G.E.; DAY, N.P. Approach to Fever in the Returning Traveler. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 6, p. 548–560, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1508435>

TOBAR, J.; RAMOS-SARMIENTO, D.; TAYUPANTA, D.; RODRÍGUEZ, M.; AGUILAR, F. Microscopic and molecular evaluation of *Strongyloides venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats. Evaluación microscópica y molecular de *Strongyloides venezuelensis* en un ciclo de vida experimental utilizando ratas Wistar. **Biomedica Revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 41, n. supl. 1, p. 35–46, 2021. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5650>

THOMPSON, C.; BOGGILD, A.K. (2015). Strongyloidiasis in immigrants and refugees in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, v. 187, n. 18, p. 1389, 2015. <https://doi.org/10.1503/cmaj.141441>

TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J.G. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. **Advances in Parasitology**, v. 88, p. 165–241, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.005>

TRAVERSA, D.; DI CESARE, A.; CONBOY, G. Canine and feline cardio-pulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. **Parasite and Vectors**, v. 23, n. 3, p. 62, 2010. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-62>

TRIANANTAPHYLLOU, A.C.; MONCOL, D.J. Cytology, reproduction, and sex determination of *Strongyloides ransomi* and *S. papillosus*. **The Journal of Parasitology**, v. 63, n. 6, p. 961–973, 1977.

TURNER, K.J.; FEDDEMA, L.; QUINN, E.H. Non-specific potentiation of IgE by parasitic infections in man. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 58, n. 2, p. 232-236, 1979. <https://doi.org/10.1159/000232197>

VADLAMUDI, R.S.; CHI, D.S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, p. 8, 2006. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-8>

VAN DOORN, H.R.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTEYN, J.C.; WISMANS, P.J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; VAN GOOL, T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 438–442, 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.01735-06>

VASQUEZ-RIOS, G.; PINEDA-REYES, R.; PINEDA-REYES, J.; MARIN, R.; RUIZ, E.F.; TERASHIMA, A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 43, n. 2, p. 167–175, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01090-x>

VERCELLI, D.; DE MONTE, L.; MONTICELLI, S.; DI BARTOLO, C.; AGRETI, A. To E or not to E? Can an IL-4-induced B cell choose between IgE and IgG4?. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 116, n. 1, p. 1–4, 1998. <https://doi.org/10.1159/000023918>

VERWEIJ, J.J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E.A.; POLDERMAN, A.M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides*

*stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 342–346, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>

VILAÇA-JÚNIOR, P.E.A.; SOARES, A.F.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; ARAÚJO, A.A.C.; TEIXEIRA, A.A.C. Efeito da administração pré-natal da dexametasona em ratas sobre os perfis glicídicos e hematológicos materno e da prole. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 606-614, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000300012>

VINEY, M.E.; LOK, J.B. *Strongyloides* spp. **WormBook: The online review of C. elegans biology**, 1–15, 2007. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.1>

VINEY, M.E.; LOK, J.B. The biology of *Strongyloides* spp. **WormBook: The online review of C. elegans biology**, 1–17, 2015. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>

VINEY, M.E. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. **Parasitology Today** (Personal ed.), v. 15, n. 6, p. 231–235, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01452-0](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01452-0)

VINEY, M.E. Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Proceedings Biological Sciences**, v. 263, n. 1367, p. 201–208, 1996. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0032>

WATTS, M.R.; JAMES, G.; SULTANA, Y.; GINN, A.N.; OUTHRED, A.C.; KONG, F.; VERWEIJ, J.J.; IREDELL, J.R.; CHEN, S.C.; LEE, R. Um ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) para *Strongyloides stercoralis* em fezes que usa um método de detecção visual com corante fluorescente SYTO-82. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 306–311, 2014. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0583>

WATTS, M.R.; ROBERTSON, G.; BRADBURY, R.S. (2016). The laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **Microbiology Australia**, v. 37, n. 1, p. 4-9, 2016. <http://dx.doi.org/10.1071/MA16003>

WEBSTER, J.; STAUFFER, W.; MITCHELL, T.; LEE, D.; O'CONNELL, E.; WEINBERG, M.; NUTMAN, T.; SAKULRAK, P.; TONGSUKH, D.; PHARES, C. Cross-Sectional Assessment of the Association of Eosinophilia with Intestinal Parasitic Infection in U.S.-Bound Refugees in Thailand: Prevalent, Age Dependent, but of Limited Clinical Utility. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 5, p. 1552–9, 2022. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.21-0853>

WILKES, CP.; BLEAY C.; PATERSON, S.; VINEY ME. The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats. **Parasite Immunol.** v. 29, n.7, p. 339-346. 2007 doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00945.x

WONG, T.Y.; SZETO, C.C.; LAI, F.F.; MAK, C.K.; LI, P. K. Nephrotic syndrome in strongyloidiasis: remission after eradication with anthelmintic agents. **Nephron**, v. 79, n. 3, p. 333–336, 1998. <https://doi.org/10.1159/000045058>

WONGPHUTORN, P.; WORASITH, C.; KOPOLRAT, K.Y.; HOMWONG, C.; SITHITHAWORN, J.; EAMUDOMKARN, C.; TECHASEN, A.; TIPPAYAWAT, P.; PITAKSAKURAT, O.; HONGSRICHAN, N.; CRELLEN, T.; SITHITHAWORN, P. Diagnostic performance of *Strongyloides*-specific IgG4 detection in urine for diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 298, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05935-6>.

WHO, World Health Organization. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030: overview**. WHO, Geneva, Switzerland, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332094>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Acesso 22 de Maio de 2023.

WHO, World Health Organization. **Soil-transmitted helminth infections**. Geneva: World Health Organization, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>. Acesso 30 de Novembro de 2023.

WULCAN, J.M.; DENNIS, M.M.; KETZIS, J.K.; BEVELOCK, T.J.; VEROCAI, G.G. *Strongyloides* spp. in cats: a review of the literature and the first report of zoonotic *Strongyloides stercoralis* in colonic epithelial nodular hyperplasia in cats. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 349, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3592-7>

YAMADA, M.; MATSUDA, S.; NAKASAWA, M.; ARIZONO, N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Parasitology**: v. 77, p. 592-594, 1991.

YU, C.; CANTOR, A.B.; YANG, H.; BROWNE, C.; WELLS, R.A.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S.H. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1387–1395, 2002. <https://doi.org/10.1084/jem.20020656>

ZOU, W.; YANG, Y.; GU, Y.; ZHU, P.; ZHANG, M.; CHENG, Z.; LIU, X.; YU, Y.; PENG, X. Repeated Blood Collection from Tail Vein of Non-Anesthetized Rats with a Vacuum Blood Collection System. **Journal of Visualized Experiments**, v. 130, p. 55852. <https://doi.org/10.3791/55852>

## APÊNDICES

## APÊNDICE A. Produção científica durante os anos de doutorado (2019–2024)

### Artigos derivados da tese:

1) RODRIGUES, J. G. M., MIRANDA, G. S., CAMELO, G. M. A., RODRIGUES, V. F., SILVA, J. K. A. O., GOUVEIA, C. B. G., PORTO, W. J. N., WANDERLEY, F. S., GEIGER, S.M., NEGRÃO-CORRÊA, D.A. Modifications to the parasitological technique of Rugai increase the diagnostic sensitivity for strongyloidiasis. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 101, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08111-y>

**(Publicado na Parasitology Research – Aceito para publicação sem modificações)**

2) RODRIGUES, J. G. M., MIRANDA, G. S., CAMELO, G. M. A., GOUVEIA, C. B. G., NEGRÃO-CORRÊA, D.A. Evaluation of antibody kinetics in rats experimentally infected with different burdens of *Strongyloides venezuelensis*, before and after treatment with ivermectin or dexamethasone. (2024)

**(Processo de submissão para publicação na Acta Tropica)**

### Artigos como primeiro autor:

#### ➤ 2020

RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; LICÁ, I. C. L.; VIEGAS-MELO, D.; TELES-REIS, A.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. Effectiveness of a handmade shell-based substrate for the breeding of *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. 1-6, 2020.

#### ➤ 2021

RODRIGUES, J. G. M.; ALBUQUERQUE, P. S. V.; NASCIMENTO, J. R.; CAMPOS, J. A. V.; GODINHO, A. S. S.; ARAÚJO, S. J.; BRITO, J. M.; JESUS, C. M.; MIRANDA, G. S.; REZENDE, M. C.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; ROCHA, C. Q.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113287, p. 113287, 2021.

#### ➤ 2022

RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; LICÁ, I. C. L.; SILVA, J. K. A. O.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. Alterations in blood glucose concentration in wild rodents, *Holochilus sciureus*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, p. e021921, 2022.

### Artigos como colaborador:

#### ➤ 2019

1) DO CARMO-SILVA, C. F.; TELES-REIS, A.; SILVA-SOARES, R. F.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; VIEGAS-MELO, D.; CARDOSO, D. T.; MIRANDA, G.

S.; SILVA-SOUZA N Spatial and Seasonal Distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area for Schistosomiasis in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 64, n. 4, p. 932-937, 2019.

2) MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; SILVA-SOUZA, N. *Schistosoma mansoni* infection in *Holochilus sciureus* shows sex-related differences in parasitological patterns. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 09, p. 173-182, 2019.

➤ **2020**

1) ALVES, R. R. S.; RODRIGUES, J. G. M.; TELES-REIS, A.; NOGUEIRA, R. A.; LICÁ, I. C. L.; LIRA, M. G. S.; ALVES, R. D. S.; SILVA-SOUZA, N.; ANDRADE, T. D. J. A. D.; MIRANDA, G. S. M. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 147, n.14, p. 1689-1699, 2020.

2) MORAIS, H. L. M. N.; FEITOSA, T. C.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA R. A.; LUZ, T. R. S. A.; SILVA-SOUZA, N.; LIMA, N. M.; ANDRADE, T. J. A. D. S.; MIRANDA, G. S. Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-7, 2020.

3) NOLETO, J. V. O.; MORAES, H. L. M. N.; LIMA T. M.; RODRIGUES, J. G. M.; TAVARES, D. T.; LIMA, K. C.; MELO, R. S. S.; MIRANDA, G. S. Use of ovitraps for the seasonal and spatial monitoring of *Aedes* spp. in an area endemic for arboviruses in Northeast Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, p. 387-393, 2020.

➤ **2021**

1) DOS REIS, A. T.; DO CARMO SILVA, C. F.; SOARES, R. F. S.; CARDOSO, D. T.; RODRIGUES, J. G. M.; NOGUEIRA, R. A.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. A preliminary study on the distribution of breeding sites of *Biomphalaria glabrata* in the municipality of Peri Mirim, a low endemicity area for schistosomiasis in Northeast Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 50, p. 1-10, 2021.

2) RODRIGUES, V. F.; CAMELO, G. M. A.; DE REZENDE, M. C.; MAGGI, L.; SILVA, J. K. A. O.; RODRIGUES, J. G. M.; ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Infection by *Strongyloides venezuelensis* attenuates chronic colitis induced by Dextran Sodium Sulfate ingestion in BALB/c mice. **Immunobiology**, 226(5), 152129, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152129>

➤ **2022**

1) GOMES, D. S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; GUEDES, T. J. F. L.; DE LUCCA JUNIOR, W.; SÁ FILHO, J. C. F.; NIZIO, D. A. C.; BLANK, A. F.; FEITOSA V. L. C.; DOLABELLA, S. S. *Lippia alba* and *Lippia gracilis* essential oils affect the viability and oviposition of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. x, p. 106434, 2022.

2) MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; SILVA, J. K. A. O.; CAMELO, G. M. A.; SILVA-SOUZA, N.; NEVES, R. H.; MACHADO-SILVA, J. R.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A. New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in



*Schistosoma mansoni* transmission. **Acta tropica**, 236, 106677, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106677>

3) MIRANDA, G. S.; **RODRIGUES, J. G. M.**; DE REZENDE, M. C.; RESENDE, S. D.; CAMELO, G. M. A.; DE OLIVEIRA SILVA, J. K. A.; MAGGI, L., RODRIGUES, V. F.; DE OLIVEIRA, V. G.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A. Experimental infection with *Schistosoma mansoni* isolated from the wild rodent *Holochilus sciureus* shows a low parasite burden but induces high schistosomiasis severity in BALB/c mice. **Parasitology**, 149(11), 1381–1396, 2022. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000774>

4) NOGUEIRA, R.N.; LIRA, M.G.S.; LICÁ, I.; FRAZÃO, G.; SANTOS, V.; FILHO, A.; RODRIGUES, J.G.M.; MIRANDA, G.S.; CARVALHO, R.; NASCIMENTO, F. Praziquantel: an update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 252, p. 111531, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2022.111531>

### ➤ **2023**

1) LIRA, M.G.S.; NOGUEIRA, R.A.; LICÁ, I.C.L.; FRAZÃO, G.C.C.G.; DOS SANTOS, V.A.F.; MENDES, A.C.C.; RODRIGUES, J.G.M.; MIRANDA, G.S.; SILVA, L.A.; GUERRA, R.N.M.; CARVALHO, R.C.; NASCIMENTO, F.R.F. Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 33, p. 1110–1125, 2023. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00442-2>

2) MIRANDA, G.S.; RODRIGUES, J.G.M.; RESENDE, S.D.; CAMELO, G.M.A.; SILVA, J.K.A.O.; DOS SANTOS, J.C.R.; SILVA-SOUZA, N.; PEREIRA, F.B.; FURTADO, L.F.V.; RABELO, É.M.L.; NEGRÃO-CORRÊA, D. From field to laboratory: isolation, genetic assessment, and parasitological behavior of *Schistosoma mansoni* obtained from naturally infected wild rodent *Holochilus sciureus* (Rodentia, Cricetidae), collected in Northeastern Brazil. **Parasitology Research**, v. 122, n. 2, p. 395–411, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07710-5>

3) LICÁ, I. C. L.; FRAZÃO, G.C.C.G.; NOGUEIRA, R.A.; LIRA, M.G.S.; DOS SANTOS, V.A.F.; RODRIGUES, J.G.M.; MIRANDA, G.S.; CARVALHO, R.C.; SILVA, L.A.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. **Parasitology**, v. 150, n. 5, p. 401–415, 2023. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000021>

4) BANDEIRA, K.S.; LIMA, T.M.; NOGUEIRA, Y.M.P.; LIMA, M.M.; RODRIGUES, J.G.M.; SILVA, M.E.C.E.; MIRANDA, G.S. Bacteriological assessment of fruit pulp sold in supermarkets in São Raimundo das Mangabeiras, Maranhão State, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 45(1): e67555, 2023. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v45i1.67555>

5) GOUVEIA-EUFRASIO, L.; DE FREITAS, G.J.C.; COSTA, M.C.; PERES-EMIDIO, E.C.; CARMO, P.H.F.; RODRIGUES, J.G.M.; DE REZENDE, M.C.; RODRIGUES, V.F.; DE BRITO, C.B.; MIRANDA, G.S.; DE LIMA, P.A.; DA SILVA, L.M.V.; OLIVEIRA, J.B.S.; DA PAIXÃO, T.A.; DA GLÓRIA DE SOUZA, D.; FAGUNDES, C.T.; PERES, N.T.A.; NEGRÃO-CORREA, D.A.; SANTOS, D.A. The Th2 Response and Alternative Activation of Macrophages Triggered by *Strongyloides venezuelensis* Is Linked to Increased Morbidity and Mortality Due to *Cryptococcosis* in Mice. **Journal of Fungi** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 10, p. 968, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9100968>

**ANEXOS**

## Anexo A - Aprovação da pesquisa no Conselho de Ética Animal da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estrongiloidíase: aprimoramento e validação de técnicas de diagnóstico e identificação de marcadores imunológicos associados à infecção", protocolo do CEUA: 129/2020 sob a responsabilidade de Deborah Aparecida Negrao Correa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 06/07/2020.

**Anexo B - Aprovação do Conselho de Ética Animal da UFMG para manutenção dos helmintos parasitos em modelos experimentais.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Manutenção de Helmintos Parasitos em Modelos Experimentais: Schistosoma mansoni; Strongyloides venezuelensis e Angiostrongylus costaricensis", protocolo do CEUA: 368/2018 sob a responsabilidade de Deborah Aparecida Negrao Correa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/12/2018.

## Anexo C – PARECER FAVORÁVEL DO CONSELHO DE ÉTICA (Maceió)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avanços no diagnóstico da esquistossomose: aplicação de técnicas convencionais e metodologias de nova geração para o controle da enfermidade em populações de regiões historicamente endêmicas no estado de Alagoas.

**Pesquisador:** Wagner José Nascimento Porto

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39997520.2.1001.5013

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Alagoas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.498.509

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa na qual serão estudados os fatores de risco e prevalência da esquistossomose em duas áreas endêmicas de Alagoas. As áreas escolhidas estão localizadas nos municípios de Maceió e Viçosa, Alagoas. Maceió é a capital do estado de Alagoas, ocupa uma área de 509,5 km<sup>2</sup>, é o município mais populoso de Alagoas, e sua população em 2017, estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), é de 1 012 387 habitantes, a cidade tem uma temperatura média anual de 25 a 29° C. Na vegetação original do município, pode-se observar a presença de herbáceas (gramíneas) e arbustivas (poucas árvores e espaçadas). Com uma taxa de urbanização da ordem de 99,75 por cento, seu Índice de Desenvolvimento Humano é de 0,735, considerado alto pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento e o primeiro do estado. No entanto, a esquistossomose ainda é considerada endêmica em alguns bairros da cidade, principalmente naqueles cujas condições de infraestrutura e socioeconômicas são bastante precárias. Viçosa é situado na Zona da Mata, localizado a 86 quilômetros da capital Maceió. O Rio Paraíba é, em extensão, o 3º maior rio de Alagoas, menor apenas que o São Francisco e o Mundau. Da nascente até a foz possui 180 km de curso, dentre esses 30 km passam por Viçosa. Em relação ao saneamento, segundo as informações fornecidas pelo SAAE – Sistema Autônomo de Água e Esgoto e a Secretaria Municipal de Infraestrutura de Viçosa – AL, o abastecimento de água abrange cerca de 62,2% do município, destes, 45% apresentam falhas contemplando de fato 17,2% de

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A. C. Simões,

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

## Anexo D – TCLE PARA PARTICIPANTES COM IDADE DE 6 – 70 ANOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante voluntário(a) da pesquisa e pelo responsável)

*“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após o consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa”*

Eu \_\_\_\_\_,

tendo sido convidado (a) a participar como voluntário (a) do Projeto de Pesquisa intitulado “**Avanços no diagnóstico da esquistossomose: aplicação de técnicas convencionais e metodologias de nova geração para o controle da enfermidade em populações de regiões historicamente endêmicas no estado de Alagoas**”, recebi do professor Dr. Wagnner José Nascimento Porto (UFAL), Müller Ribeiro Andrade (UFAL), Flaviana Santos Wanderley (UNCISAL), Fernando Luiz de Andrade Maia (UNCISAL), Sílvio Santana Dolabella (UFS), Deborah Aparecida Negrão-Corrêa (UFMG) e Stefan Michael Geiger (UFMG), responsáveis por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- O projeto se destina a estudar os aspectos epidemiológicos da esquistossomose (barriga d’água) no povoado Vila Nova, Viçosa/AL e áreas endêmicas para esquistossomose em Maceió/AL, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico;
- A importância deste estudo é a de estudar se eu, enquanto morador (a) do dessas localidades e exposto (a) aos hábitos e ambientes daqui, estou com essa verminose e qual o melhor exame para identificar a infecção por esse verme.
- Esse projeto começará em Abril de 2022 e terminará em Abril de 2023.
- O estudo será feito da seguinte maneira: será realizado uma entrevista em cada participante da pesquisa, usando um questionário padrão, serão coletadas amostras de fezes em potes específicos e amostras de sangue com a finalidade de realizar exames para identificar se tem vermes, os exames serão feitos no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL.
- Eu participarei das seguintes etapas: responder ao questionário, entregar as fezes, coleta de sangue e participar de palestras para orientação para não pegar essa verminose.
- Os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: desconforto em responder o questionário, na coleta do sangue e/ou para entregar a amostra do material fecal. Por isso, sempre serei acompanhado e orientado por um Agente Comunitário e também terei o suporte da equipe da Unidade Básica de Saúde (UBS) quando for tirar sangue. Mas, se eu não me sentir à vontade poderei desistir de participar da pesquisa em qualquer etapa, sem que aconteça nenhum prejuízo para mim.
- Os benefícios que posso ter com a minha participação, são: receber o resultado do exame e, se der positivo, vou ser encaminhado (a) a UBS, para ser feito o atendimento, onde receberei a receita e as orientações para o tratamento. Com as repostas do questionário vou contribuir para a formação de dados que podem servir para melhoria da qualidade de saúde no povoado.
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

- A qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo. Sempre que precisar, posso telefonar para o Dr. Wagner Porto, professor responsável pela pesquisa (telefones: 3214-1070, Laboratório de Parasitologia/ICBS/UFAL e/ou 99999-1935, telefone pessoal)
- As informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- O estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa.
- Eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Se eu tiver dúvidas sobre meus direitos como participante de pesquisa, posso contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da UFAL, pelo telefone: (82) 3214- 1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Este papel está baseado nas diretrizes éticas brasileiras (Res. CNS 466/12 e complementares).

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO (A) OU OBRIGADO (A).

<b>Endereço do (a) participante</b> Domicílio: (rua, praça, conjunto): Nº: Complemento: Bairro: CEP Cidade: Telefone: Ponto de referência:	
<b>Endereço dos responsáveis pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):</b> <b>Instituição:</b> Universidade Federal de Alagoas - UFAL <b>Endereço:</b> Av. Lourival de Melo Mota Nº: S/N <b>Bairro:</b> Tabuleiro dos Martins <b>CEP:</b> 57072-900 <b>Cidade:</b> Maceió – AL. <b>Telefones:</b> (82) 3214-1070 <b>E-mail:</b> <a href="mailto:wagnerporto@icbs.ufal.br">wagnerporto@icbs.ufal.br</a>	
Assinatura ou impressão datiloscópica da voluntária ou responsável legal e rubricar as demais folhas.	Wagner José Nascimento Porto