



**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina  
Doenças Infecciosas e Parasitárias**



# Estrongiloidíase

**Marcelo Andreetta Corral  
Aluno de Doutorado**

**[marcelo.corral@usp.br](mailto:marcelo.corral@usp.br)**

# Plano de Aula

- ✓ Histórico e Epidemiologia da Estrongiloidíase
- ✓ O parasito *Strongyloides stercoralis*
  - Morfologia e Biologia
  - Ciclos Biológicos
- ✓ Relação Parasito-Hospedeiro
  - Patologia
- ✓ Diagnósticos
  
- ✓ Linhas de pesquisa no Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose e Outras Parasitoses – LIM-06 HCFMUSP:
  - Modelo experimental
  - Estrongiloidíase e Imunodepressão
  - Imunodiagnóstico e imunoproteômica

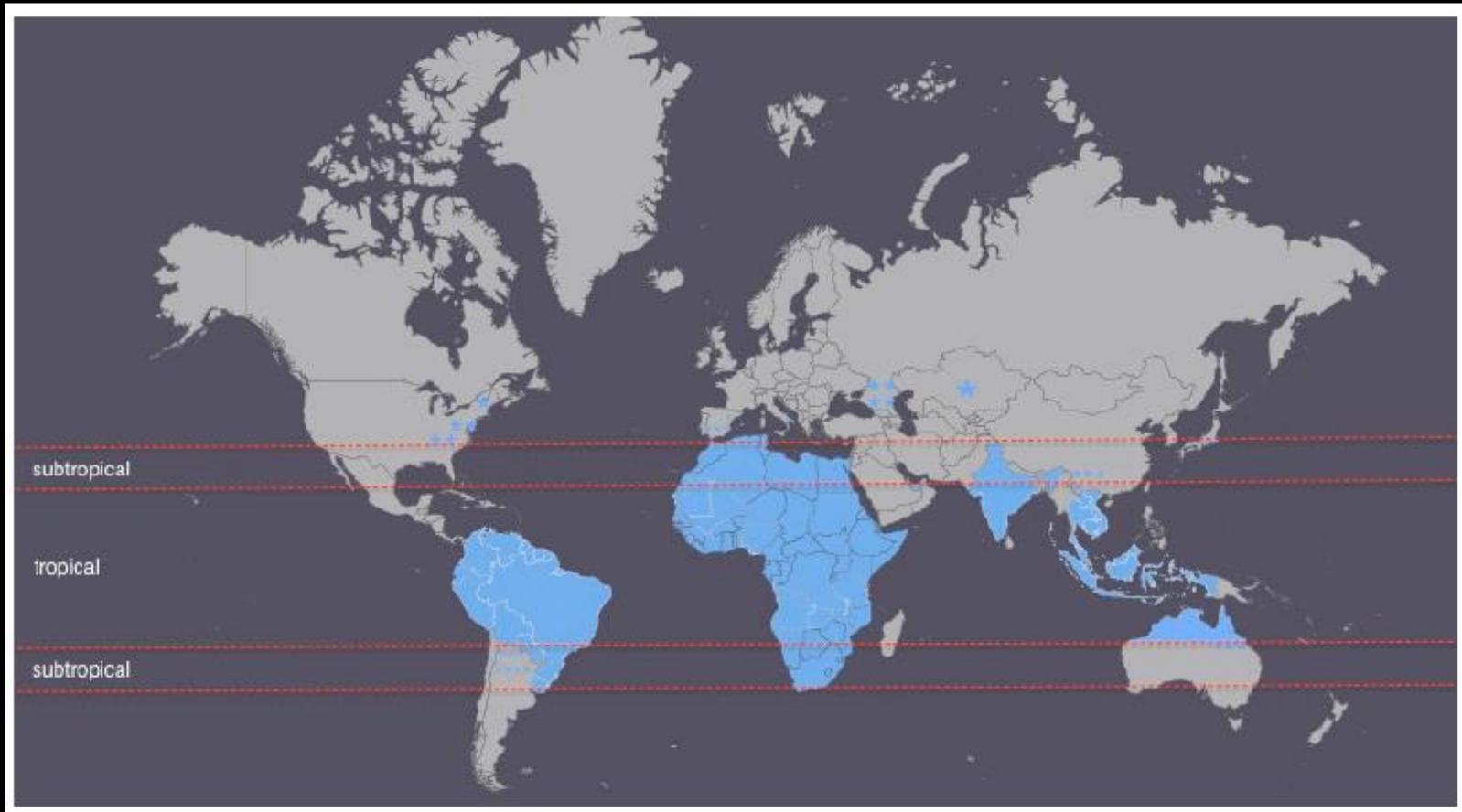
# Histórico

- Diarreia da Conchinchina (Louis Normand)
- *Anguilulla stercoralis* → Anguilulose (Bavay, 1876)
- *Strongyloides intestinalis* (Grassi, 1879)
- *Strongyloides stercoralis* (Stiles e Hassall 1902)

(Grove, 1996)

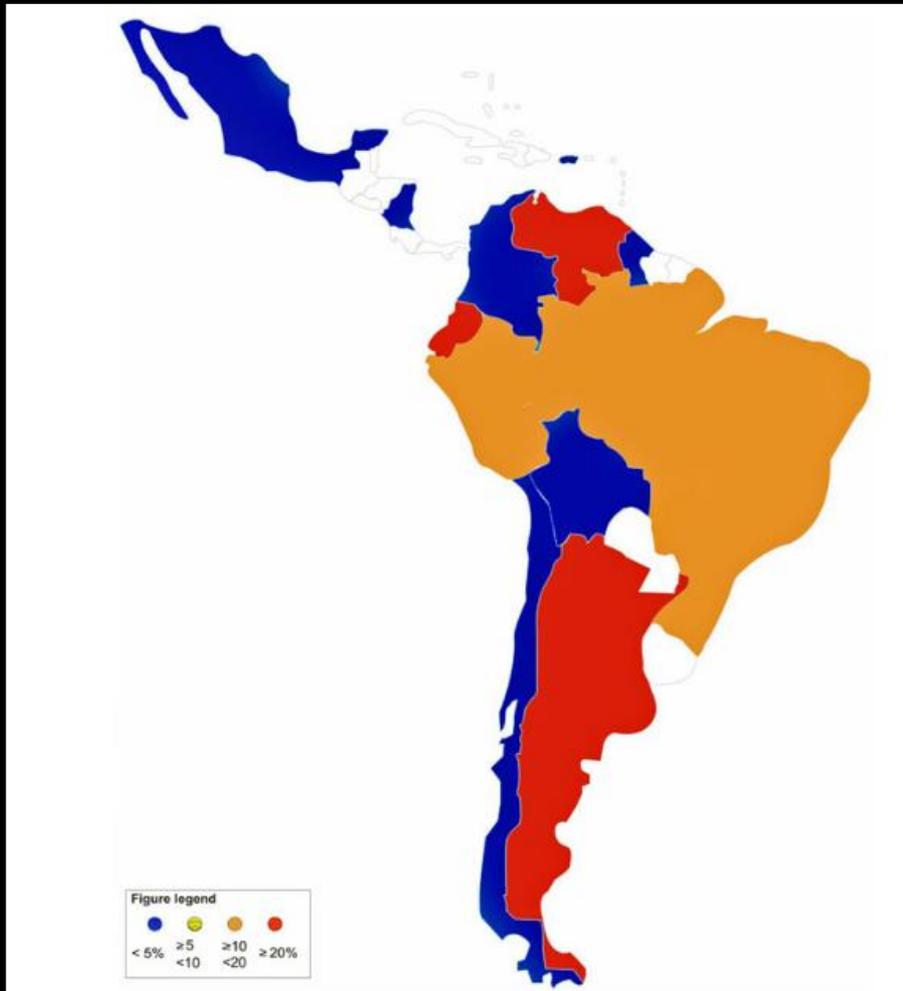
# Distribuição Mundial da Estrongiloidíase

30 a 100 milhões de pessoas infectadas



(Beknazarova et al., 2016)

# Distribuição na América Latina



- 5,5% de ocorrência no Brasil → Negligenciada

# Taxonomia

- Domínio: Eucariota
- Reino: Metazoa
- Filo: Nematoda
- Classe: Chromadorea
- Ordem: Rhabditida
- Família: Strongyloididae
- Gênero: *Strongyloides*
- Espécie: *Strongyloides stercoralis*

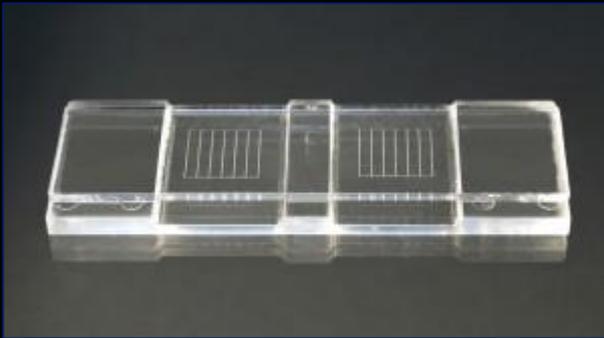
(NCBI, 2015)

# Aspectos biológicos

Ovo



# Técnica de OPG (Ovos por grama de fezes)



NaCl saturado

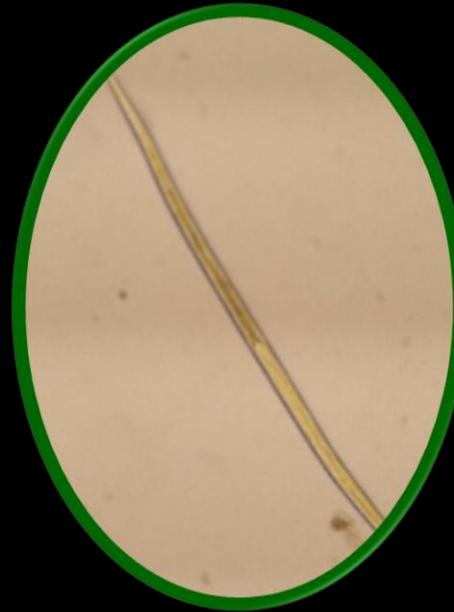


# Aspectos biológicos

Larva rabditoide



Larva filarioide



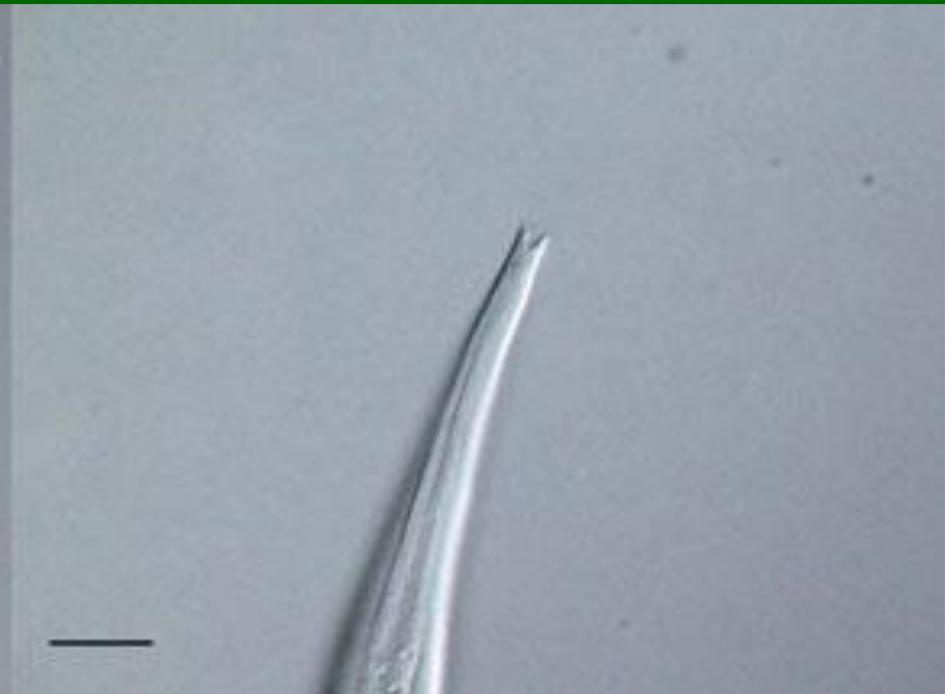
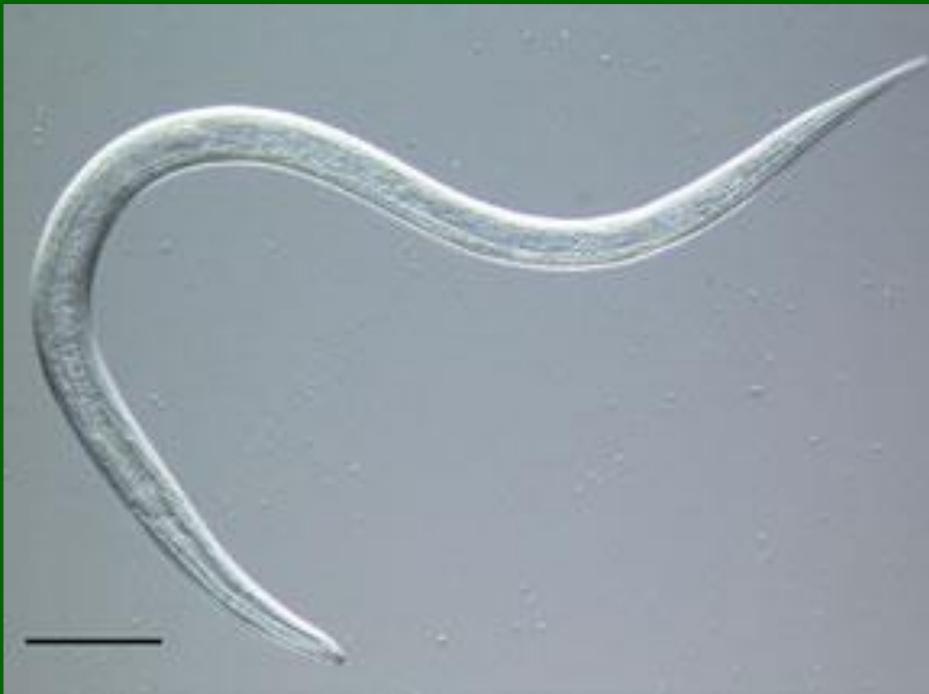
# Aspectos biológicos: Comparação entre larvas de *Strongyloides stercoralis* e Ancilostomídeos

Larva Rabditoide	<i>S. stercoralis</i>	Ancilostomídeos
Primórdio genital	visível	Não visível
Vestíbulo bucal	curto	longo



# Aspectos biológicos: Comparação entre larvas de *Strongyloides stercoralis* e Ancilostomídeos

Larva Filarioide	<i>S. stercoralis</i>	Ancilostomídeos
cauda	bifurcada	afilada



# Aspectos biológicos

Fêmea de Vida Livre



Macho de Vida Livre



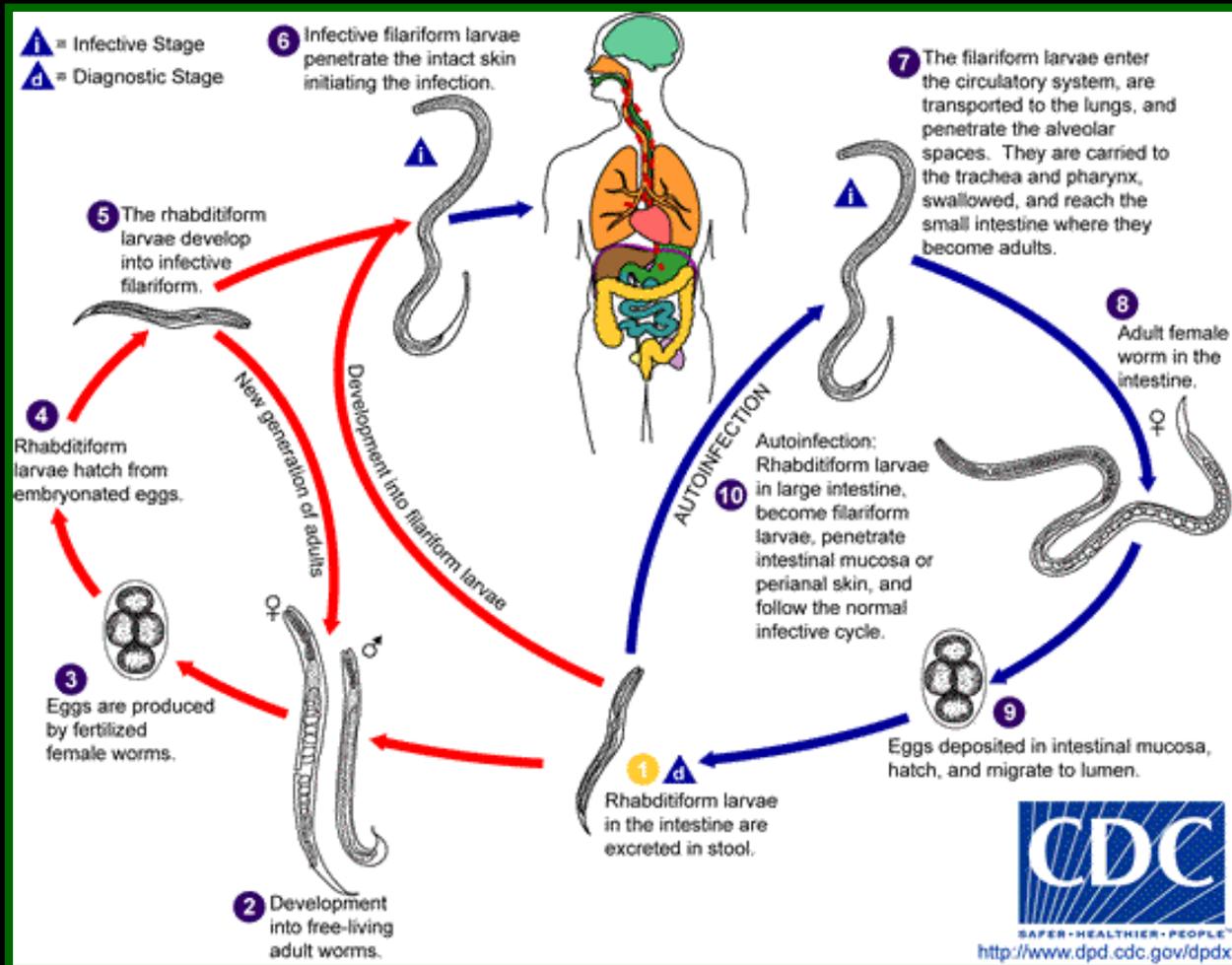
# Aspectos biológicos



Fêmea  
Partenogenética



# Ciclo biológico



# Ciclo biológico

- Determinação do sexo durante a oogênese ou embriogênese ( $n$ ,  $2n$  e  $3n$ ).
- Ambiente (Temperatura e umidade).

Triantaphyllou, Moncol, 1977

Viney, Lok, 2008

Nemetschke et al., 2010

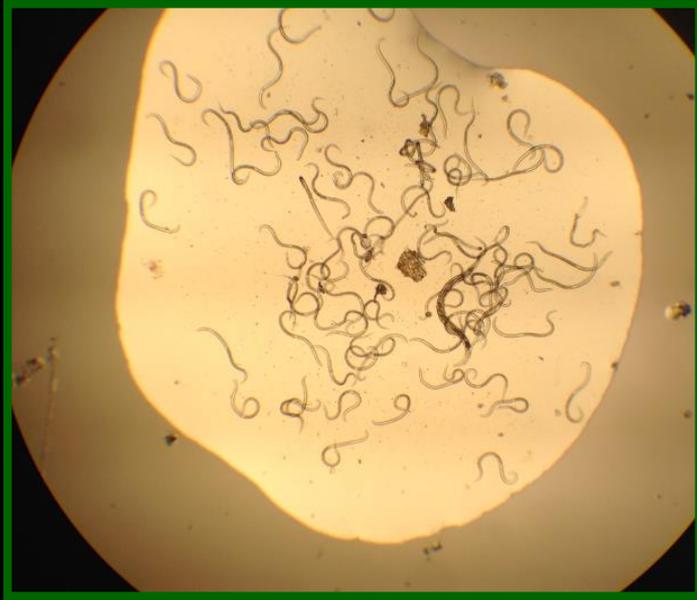
# Obtenção de Larvas



# Obtenção de Larvas



# Obtenção de Larvas



# Obtenção de Larvas



# Modelo experimental





# Fêmeas parasitas



Fêmeas  
parasitas  
e  
OVOS



# Fêmeas parasitas



# Resposta Imune

- *Strongyloides ratti*
- *Strongyloides venezuelensis*
- Caracterização antígenos  
(Costa-Cruz et al., 2003; Gonçalves et al., 2012)
- Modulação sistema imune  
(Negrão-Corrêa et al., 2006; Tefé-Silva et al., 2012)

# Mecanismos de resposta imunológica

- *Toll-like receptors* estimulam macrófagos que secretam moléculas pró-inflamatórias inespecíficas favorecendo o aumento na secreção de muco intestinal.

(Iriemenamm et al., 2010)

- ✓ Padrão de Resposta Imune **Th2** → **Helminto**
  - IL-3 → basófilos
  - IL-4 → basófilos, Linf. B produção IgE, IgG1, Eosinófilos, contratura da musculatura lisa do intestino
  - IL-5 → Eosinófilos, IgA
  - IL-6 → Granulócitos e Linf. B e T
  - IL-10 e IL-13 → modulação negativa Th1

(Concha, Harrington e Rogers, 2005; Costa-Cruz 2014)

# Produção de anticorpos

- IgM, IgA e IgG específicos e IgE
- IgG4 e IgG1

Rossi et al., 1993

Rodrigues et al., 2007

Marcos et al., 2011

# Patogenia e Sintomas

- Forma assintomática ou sintomas inespecíficos
- ✓ Lesões cutâneas
- ✓ Lesões pulmonares
- ✓ Lesões intestinais

- Hiperinfecção
- Doença disseminada



## Imunossupressão:

- Transplantes
- Corticosteroides
- HTLV-1

Gryschek e Siciliano, 2005

Olsen et al., 2009

# Aspectos Clínicos

- Variáveis e inespecíficos

## Forma aguda

- Lesões papulares e urticária (penetração larvária)
- Tosse seca, dispneia e edema (pulmões)
- Dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos

## Forma crônica

- Assintomático, níveis baixos de carga parasitária
- Dor abdominal, epigástrica, náuseas, vômitos e diarreia

# Aspectos Clínicos

Imunocomprometidos – uso de corticosteroides:

- Processo de autoinfecção acelerado
- Hiperinfecção
- Doença disseminada → Disseminação hematogênica de Enterobactérias
  - Taxa de mortalidade > 50% (*Roxby et al., 2009; CDC, 2012*)

# Transplante de órgãos

- Subestimado e pouco descrito na literatura
  - 5% dos pacientes tem infecções parasitárias
- Órgão transplantado pode ser fonte de infecção para o receptor
- Necessário diagnóstico precoce e rápido

*(Ben-Youssef et al., 2005; Patel et al., 2008)*

- Casos de hiperinfecção tem sido documentada após transplante de órgãos:

**Renal** (*Devault et al., 1989; Valar et al., 2007; Said et al., 2007*)

**Hepático** (*Vilela et al., 2009*)

**Cardíaco** (*Shaeffer et al., 2004; Marsry; O'Donnell, 2005*)

**Medula óssea** (*Orlent et al., 2002; Barsoum, 2004; Dulley et al., 2009*)

- Possivelmente pela utilização de terapia com corticoesteroides

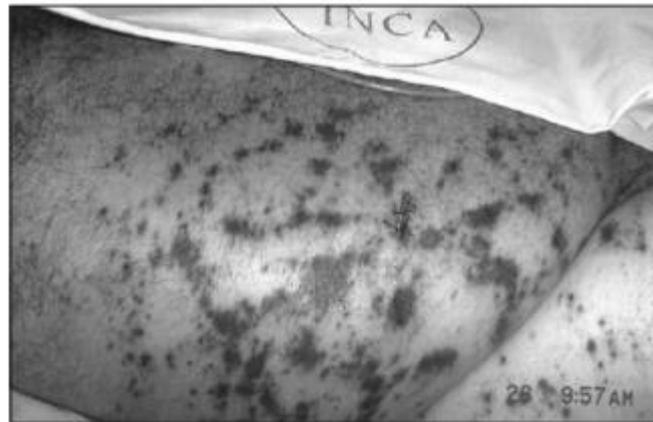


Figura 1 - Lesão Purpúrica Peri-Umbilical na Região Abdominal em Paciente com Câncer Portador de Es-trongiloidíase Disseminada<sup>6</sup>

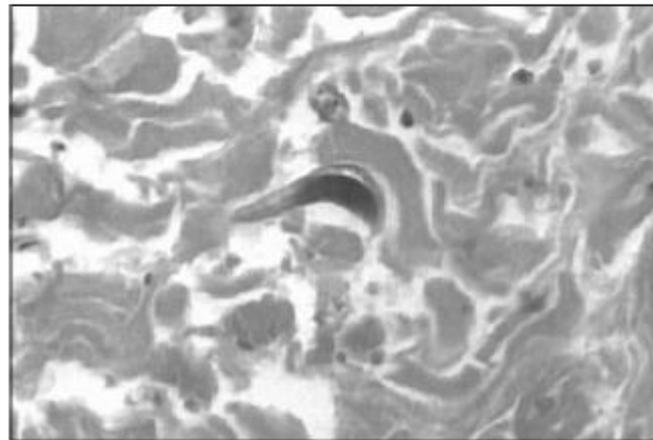


Figura 2 - Fragmento de Pele (corado com hematoxili-na-eosina) Revelando Larva de *S. Stercoralis* dentro de Capilar da Derme<sup>6</sup>

# Diagnóstico da Estrongiloidíase em pacientes com diferentes formas de imunossupressão

Autor	Condição clínica	Frequência
Graeff-Teixeira, 1997	Doenças Oncohematológicas	8,3%
Chieffi, 2000	HTLV-1	12,1%
Schaffel, 2001	Doenças Oncohematológicas	4%
Zago-Gomes, 2002	Etilistas	25,8%
Machado, 2008	Neoplasias Gastrointestinais	9,1%
Batista, 2013	Doador/Receptor Rim e fígado	2,4%

## ORIGINAL ARTICLE

**Immunofluorescence assay for diagnosis of strongyloidiasis in immunocompromised patients**

MAIARA GOTTARDI<sup>1</sup>, FABIANA M. PAULA<sup>1</sup>, MARCELO A. CORRAL<sup>1</sup>,  
DIRCE MARY C. MEISEL<sup>1</sup>, SILVIA F. COSTA<sup>2</sup>, EDSON ABDALA<sup>2</sup>, LIGIA C. PIERROTTI<sup>3</sup>,  
JULIANA YAMASHIRO<sup>3</sup>, PEDRO PAULO CHIEFFI<sup>4</sup> & RONALDO CESAR B. GRYSCHKEK<sup>1</sup>

Table II. Distribution of anti-*Strongyloides* IgG titers by IFA using infective *S. venezuelensis* larvae antigen.

Serum	n	Titers							Total positive	
		40	80	160	320	640	1280	2560	n	%
<b>Groups</b>										
I	22	1	5	5	4	5	1	–	21	95.4
II	32	1	–	1	–	–	–	–	2	6.2
III	40	–	–	–	–	–	–	1	1	2.5
<b>Immunocompromised</b>										
HIV	18	–	1	4	–	–	–	–	5	27.8
HTLV-1	32	2	5	2	–	–	–	–	9	28.1
RT	50	3	2	3	–	2	–	1	11	22.0
LT	50	2	2	5	2	–	–	–	11	22.0
BMT	50	1	1	2	3	–	–	–	7	14.0

Groups: I, patients copropositive for *S. stercoralis*; II, patients positive for other parasite infections; and III, patients copronegative for parasite infections. BMT, bone marrow transplantation candidates; HIV, human immunodeficiency virus; HTLV-1, human T-cell leukemia virus type 1; IFA, immunofluorescence assay; LT, liver transplantation candidates; RT, renal transplant candidates.

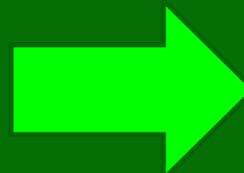
# Profilaxia e Tratamento

**Profilaxia:** Impedir o acesso de larvas filarioides existentes no solo à pele ou às mucosas de hospedeiros suscetíveis.

- Tratamento sanitário adequado para as fezes;
- Lavagem dos alimentos;
- Uso de calçados;
- Identificação, orientação e tratamento do infectado.

**Tratamento:**

- Ivermectina (200 µg/Kg)
- Derivados benzoimidazólicos:
  - Tiabendazol (25mg/Kg 2x/ dia/ 2 dias)
  - Cambendazol (5mg/Kg)
  - Albendazol (400mg/Kg x 3 dias)



Controle de Cura

# Ivermectina – Ivermec®

- Imobilização do verme por meio de uma **paralisia tônica muscular**.
- Interação entre o fármaco e os **canais de cloro** ativados por glutamato em células nervosas e musculares causando hiperpolarização, por meio do aumento da permeabilidade a esses íons.



# Diagnóstico

- Parasitológico
- Inmunológico
- Molecular

# Diagnóstico parasitológico



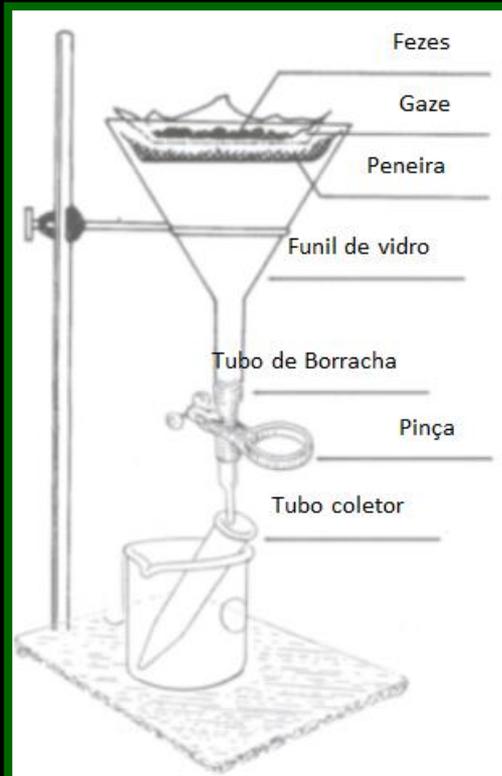
Acervo pessoal

## Sedimentação Espontânea

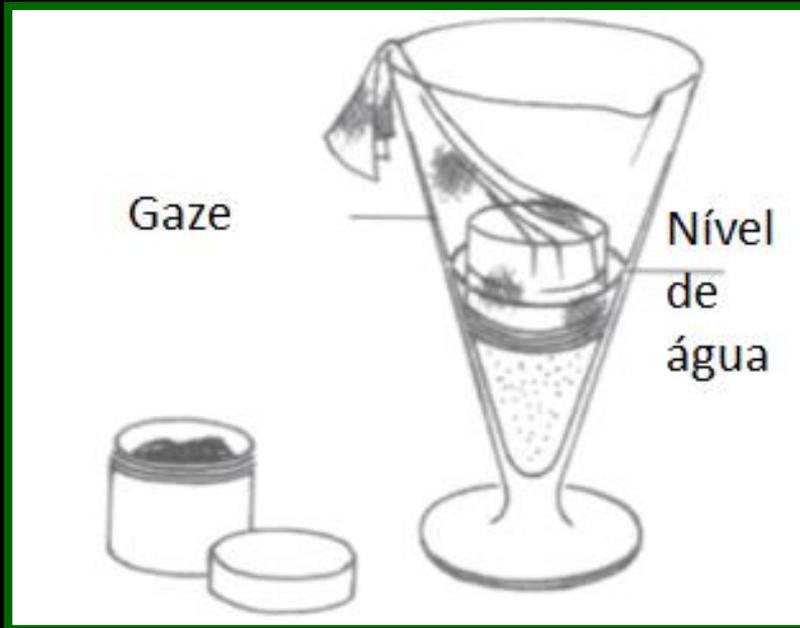
Lutz, 1919;

Hoffman, Pons e Janer, 1934

# Diagnóstico parasitológico: Técnica de Baermann (1917)- Moraes (1948)



# Diagnóstico parasitológico: Rugai (1954)



# Técnicas de Cultura



Acervo pessoal



**Cultura em placa de ágar**

Koga et al., 1991; Paula et al., 2013

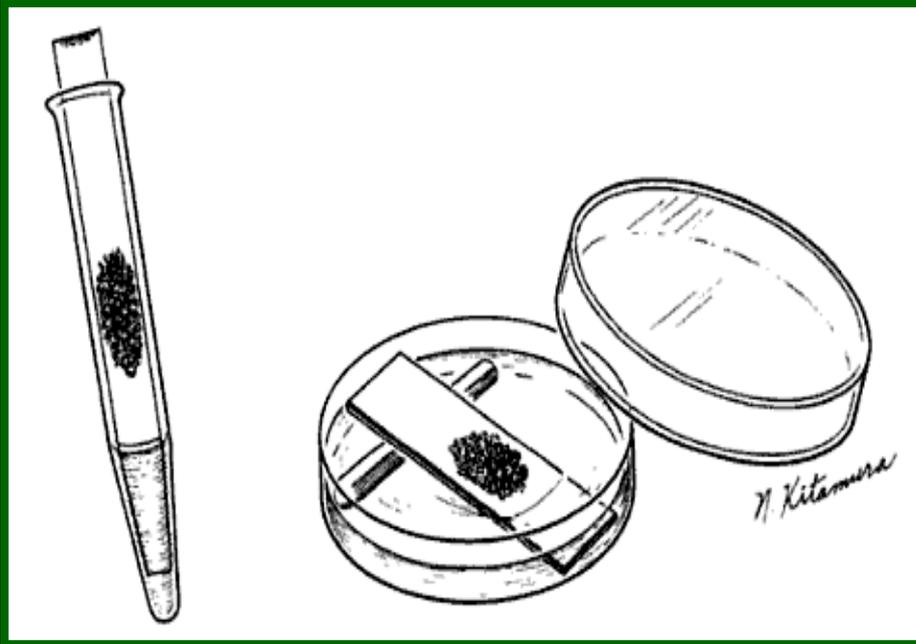


# Técnicas de Cultura



# Métodos de Cultura

De Carli, 2007



## Cultura em papel de filtro

Harada e Mori, 1955

Acervo pessoal



## Cultura em carvão animal

Looss, 1911

# Harada-Mori



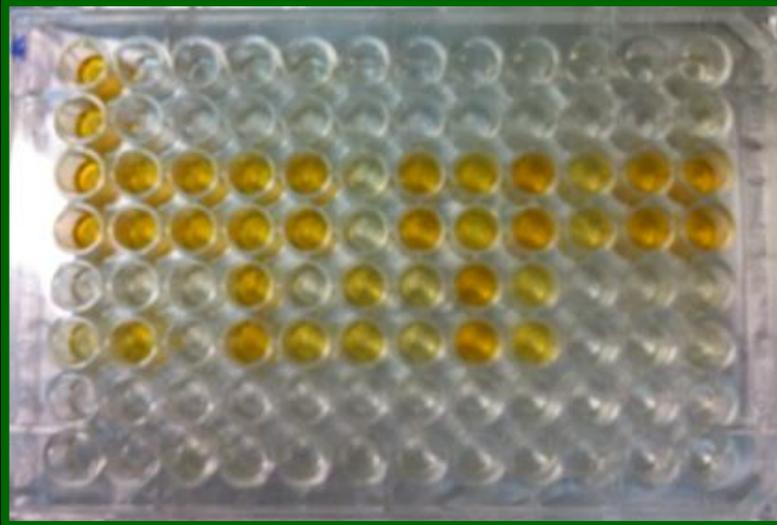
# Diagnóstico parasitológico

- Baixa sensibilidade:
  - liberação de larvas nas fezes é irregular e intermitente;
  - Maior número de amostras de fezes analisadas para melhorar sensibilidade.
- 7 amostras para 100% sensibilidade;
- Cultura: demora na liberação do resultado.

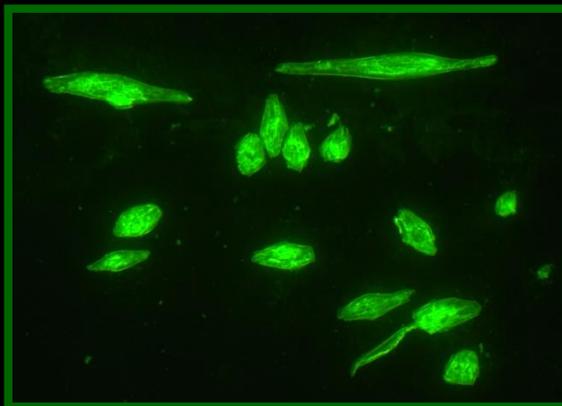
(Uparanukraw et al., 1999; Costa-Cruz et al., 2003)

# Sorologia

→ Não dependendo diretamente da eliminação de larvas.



ELISA



RIFI



*Western-blotting*

# Sorologia e Estrongiloidíase

PubMed  Search

Create RSS Create alert Advanced Help

Redirecting web traffic to HTTPS. [Read more](#) about our https testing.

Format: Summary ▾ Sort by: Most Recent ▾ Send to ▾ Filters: [Manage Filters](#)

**Search results**  
Items: 1 to 20 of 147

<< First < Prev Page 1 of 8 Next > Last >>

**Titles with your search terms**

Usefulness of **Strongyloides stercoralis serology** in the man: [Am J Trop Med Hyg. 2014]

PubMed  Search

Create RSS Create alert Advanced Help

Redirecting web traffic to HTTPS. [Read more](#) about our https testing.

Format: Summary ▾ Sort by: Most Recent ▾ Send to ▾ Filters: [Manage Filters](#)

**Search results**  
Items: 1 to 20 of 127

<< First < Prev Page 1 of 7 Next > Last >>

**Titles with your search terms**

Use of larval, parasitic female and egg antigens from **Strongyloides venezue** [Parasitology. 2012]

Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic female, and ova [Diagn Microbiol Infect Dis. 2012]

# Sorología: Antígenos

- Antígeno homólogo
  - *Strongyloides stercoralis*
  
- Antígeno heterólogo
  - *Strongyloides ratti*
  - *Strongyloides venezuelensis*

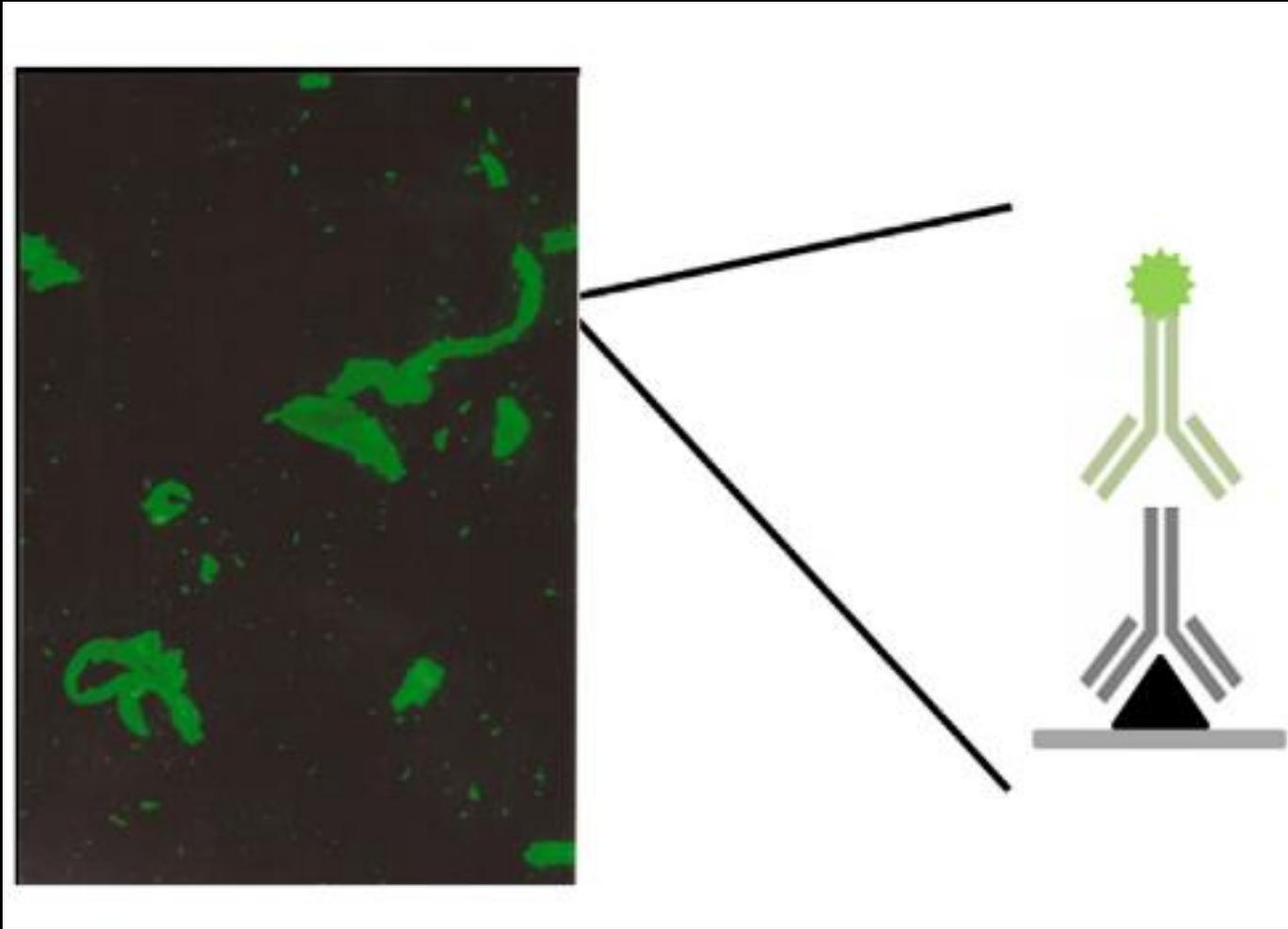
(Costa-Cruz et al., 1997, Levenhagen, Costa-Cruz, 2014)

## Comparative evaluation of *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larval antigen for diagnosis of strongyloidiasis in an endemic area of opisthorchiasis

Chatanun Eamudomkarn<sup>1</sup> · Paiboon Sithithaworn<sup>1,2,6</sup> · Jiraporn Sithithaworn<sup>3</sup> · Sasithorn Kaewkes<sup>1,2</sup> · Banchob Sripan<sup>4,2</sup> · Makoto Itoh<sup>5</sup>

**Table 2** Characteristics of ELISA with *S. ratti* and *S. stercoralis* antigens for diagnosis of strongyloidiasis

Diagnostic method	Sensitivity (%) (95 % CI)	Specificity (%) (95 % CI)	Predictive value (%) (95 % CI)		Kappa value
			Positive	Negative	
<i>S. ratti</i> ELISA	84.5 (75.8–91.1)	100.0 (69.0–100.0)	100.0 (95.6–100.0)	40.0 (21.2–61.3)	0.51
<i>S. stercoralis</i> ELISA	83.5 (74.6–90.3)	100.0 (69.0–100.0)	100.0 (95.5–100.0)	38.5 (20.3–59.4)	0.49



(Levenhagen, Costa-Cruz, 2014)

# Diagnóstico Sorológico

RIFI

Antígeno própria larva e/ou cortes de larvas

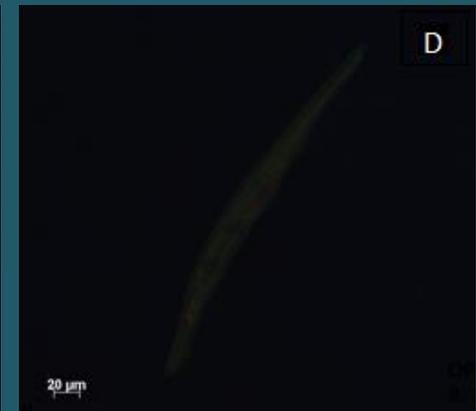
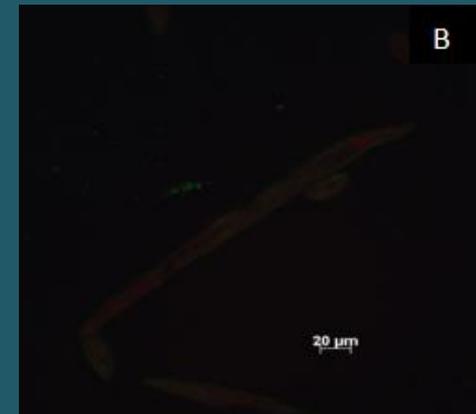
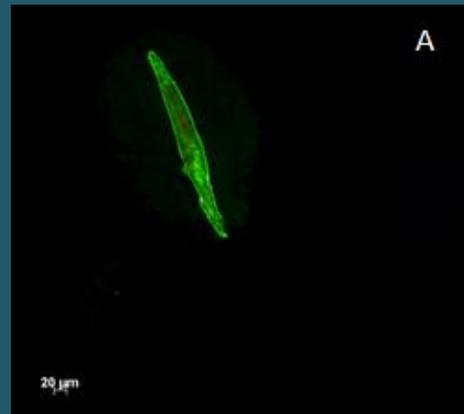
Sensibilidade: 95%  
Especificidade: 95,8%

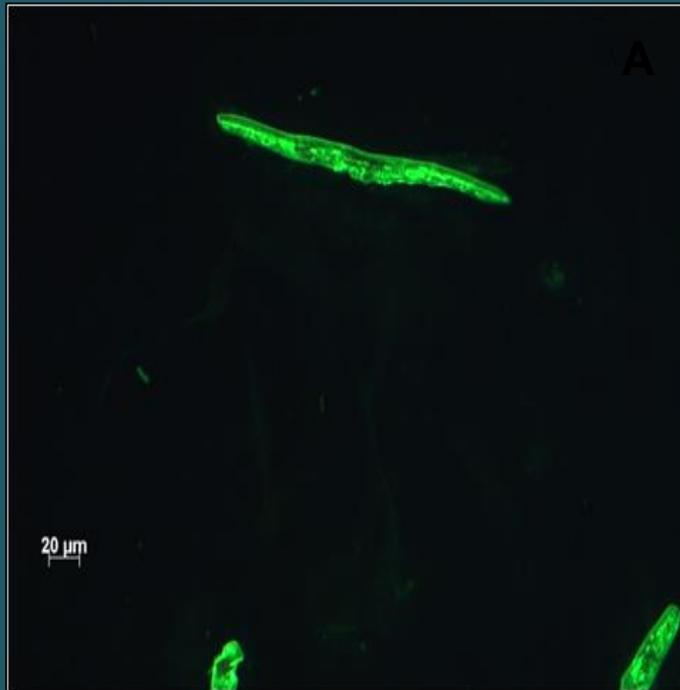
Cortes de larvas filarioides de *S. venezuelensis*  
(4 $\mu$ ), 20X.

(A) Soro positivo

(B) Soro negativo

(C e D) Soro positivo para ancilostomídeo e *S. mansoni*





Cortes de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (4μ), 20X.

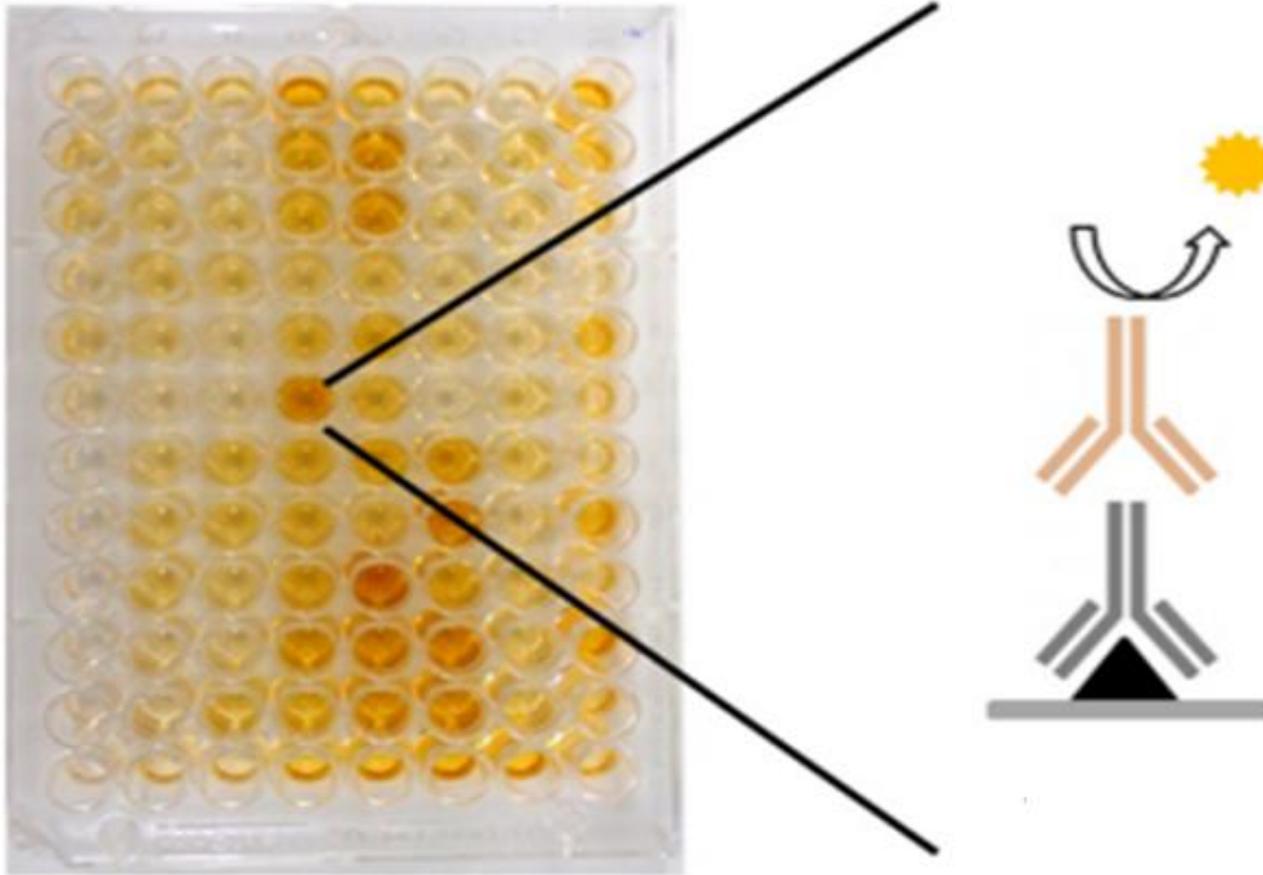
(A) Soro de paciente candidato a tx renal positivo

(B) Soro de paciente candidato a tx renal negativo

# Sorologia: Antígenos

- Variação na obtenção de frações antigênicas  
(Costa-Cruz et al., 2003; Rodrigues et al., 2007)
  - Frações antigênicas tratadas com detergente ou purificadas  
(Feliciano et al., 2010; Inês et al., 2013; Levenhagen, Costa-Cruz, 2014; Corral 2015a,b)
  - Proteínas de membrana como fonte antigênica  
(Northern et al., 1989; Corral et al., 2015a,b)
  - Uso de detergentes
    - CHAPS
    - SDS
- (Bollag, 1996; Linke, 2009)

# ELISA

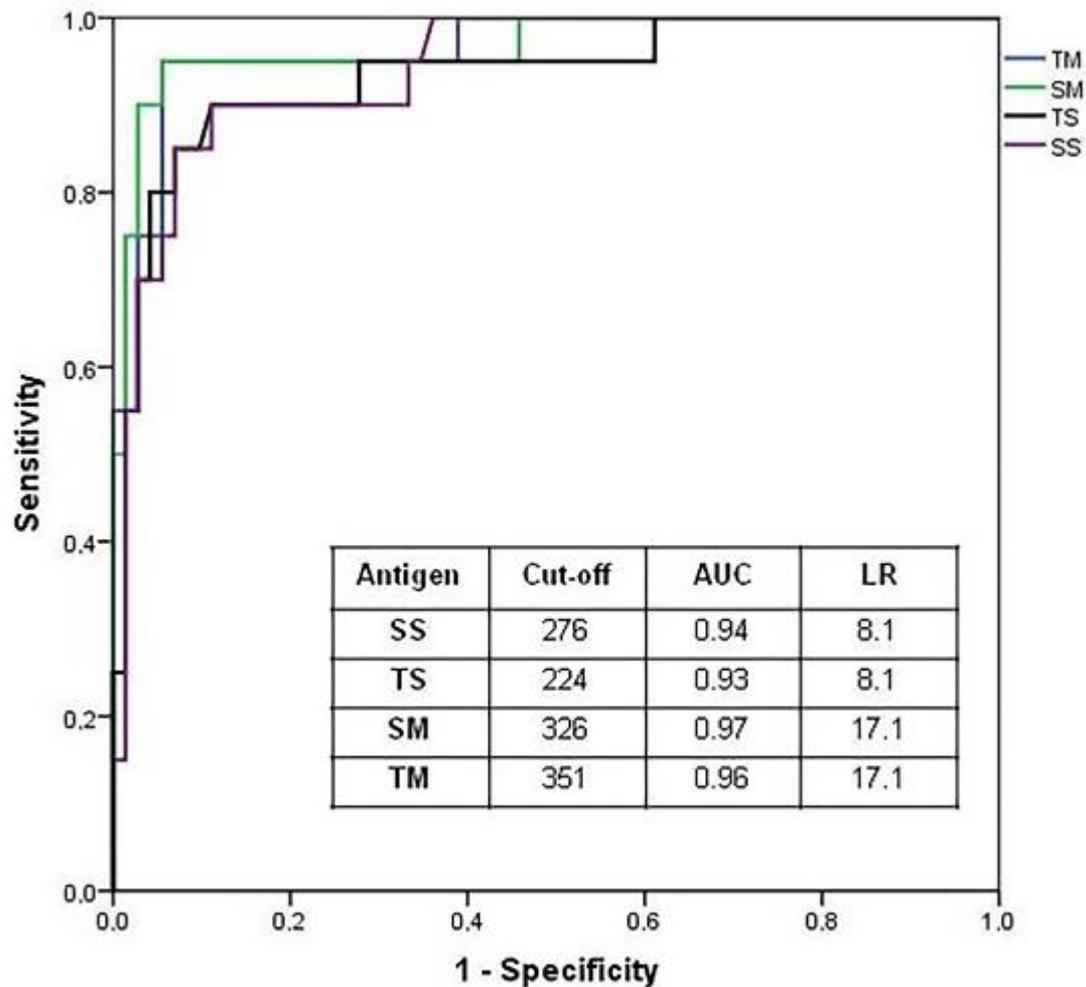


(Levenhagen, Costa-Cruz, 2014)

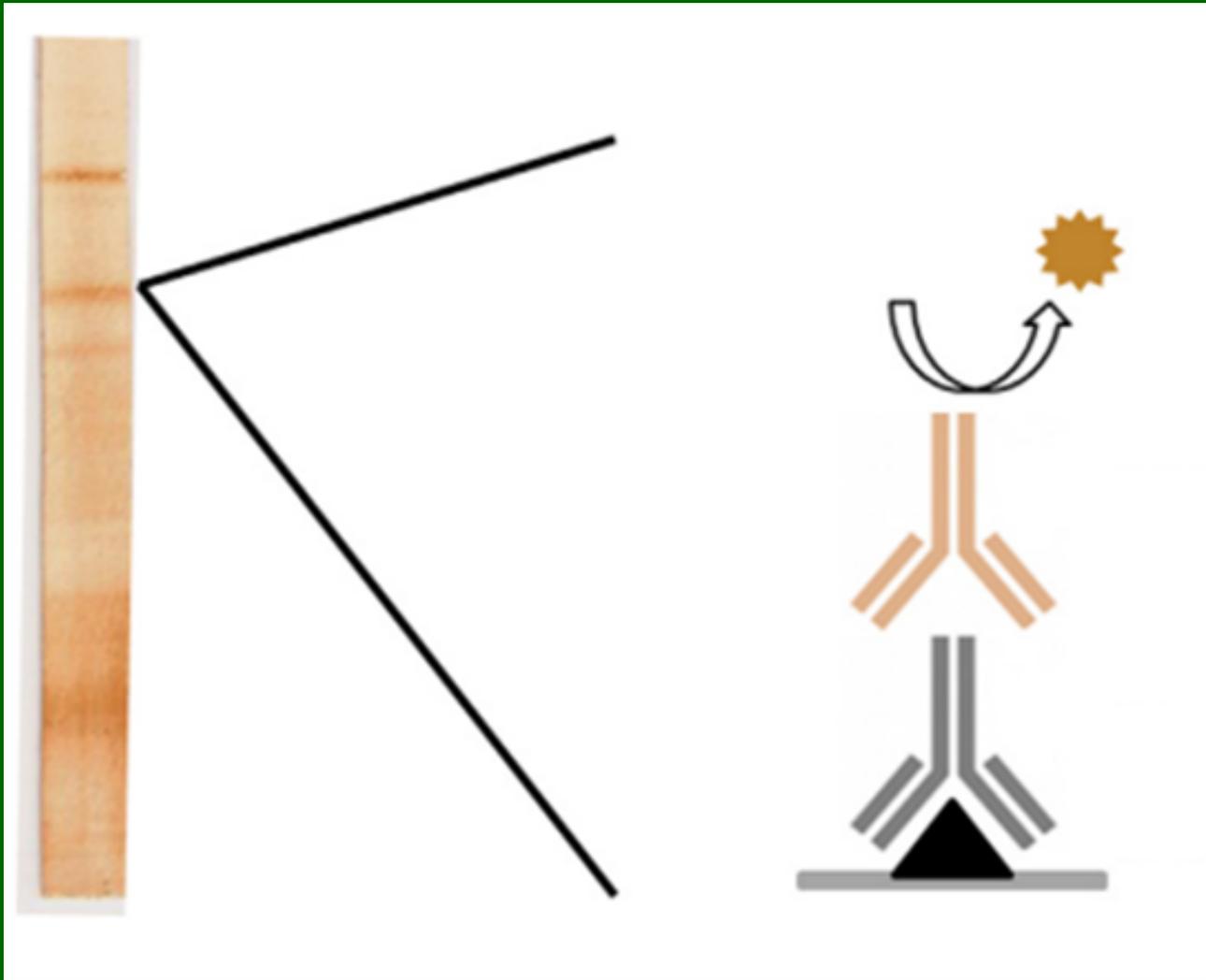
## Análise dos resultados do ELISA: Curva ROC



- *Cut off*
- Sensibilidade
- Especificidade
- *Likelihood ratio*
- Área sobre a curva
- Eficácia
- Índice Kappa



# Western-blotting



(Levenhagen, Costa-Cruz, 2014)



Contents lists available at ScienceDirect

## Immunology Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/immllet](http://www.elsevier.com/locate/immllet)

## IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection

Henrique T. Gonzaga<sup>a</sup>, Vanessa S. Ribeiro<sup>a</sup>, Nágilla D. Feliciano<sup>a</sup>, Marianna N. Manhani<sup>a</sup>,  
Deise A.O. Silva<sup>a</sup>, Marlene T. Ueta<sup>b</sup>, Julia M. Costa-Cruz<sup>a,\*</sup>

**Table 2**

IgG avidity pattern in ELISA and immunoblot reactions with *Strongyloides venezuelensis* antigens in ten cases discrepant of the avidity ELISA index cut-off (AI = 75%) in serologically positive patients with larval output (G1) or undetectable larvae in stool specimens (G2) tested in the immunoblot.

Cases	ELISA Avidity index (%)		Immunoblot Decrease in intensity of recognition <sup>b</sup>							
	Screening <sup>a</sup>	Mean	MW (kDa)							
			120–160	65–70	52–55	45	41	35–28	21	19
<i>G1</i>										
1	92.7	103.1	–	–	–	–	–	–	–	–
2	87.8	91.4	+++	+++	–	–	–	+	–	–
3	84.9	89.3	–	+	++	–	–	+++	++	–
4		100.2	–							
5	89.8	85.4	–	++	+			+++	+++	
<i>G2</i>										
1	74.9	80.2	++	++	+++			+++		
2	71.4	74.0	++	+++	++			+++	+++	+++
3	69.6	71.3	+++	+++	+++	++	++	+++		
4	68.7	79.0	+++	++	+++	++	++	+++		
5	46.9	46.2	+++	++	+++			+++		

MW: molecular weight. kDa: kiloDaltons.

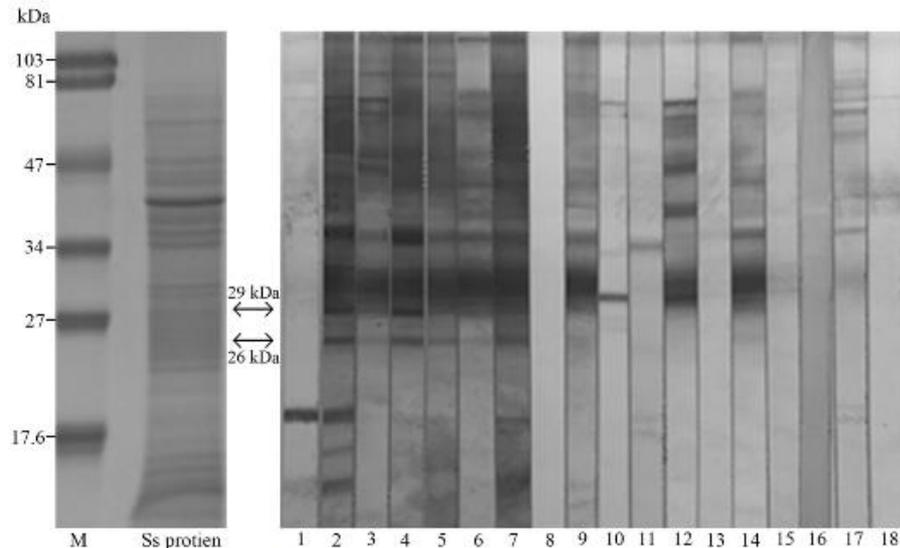
<sup>a</sup> Screening AI was calculated based on the screening serum dilution of 1:160.

<sup>b</sup> Decrease in intensity of recognition categories: – or + low avidity bands indicated by high decrease in intensity of recognition. ++ or +++ high avidity bands indicated by low decrease in intensity of recognition.

## *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis

Rutchanee Rodpai<sup>1,2</sup> · Pewpan M. Intapan<sup>1,2</sup> · Tongjit Thanchomngang<sup>2,3</sup> ·  
Oranuch Sanpool<sup>1,2,3</sup> · Penchom Janwan<sup>4</sup> · Porntip Laummaunwai<sup>1,2</sup> ·  
Chaisiri Wongkham<sup>5</sup> · Tonkla Insawang<sup>6</sup> · Wanchai Maleewong<sup>1,2</sup>

Received: 16 May 2016 / Accepted: 7 June 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016



**Fig. 1** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the *Strongyloides stercoralis* third-stage larval extract (left) and their representative immunoblotting reaction patterns (right). Lane M, molecular mass markers and lane Ss protein, the *S. stercoralis* extract was stained with Colloidal Coomassie Blue. Blots developed with sera from (1), pooled healthy control (2), pooled positive reference (3–5), strongyloidiasis (6), hookworm infection (7), opisthorchiasis viverrini

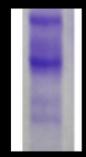
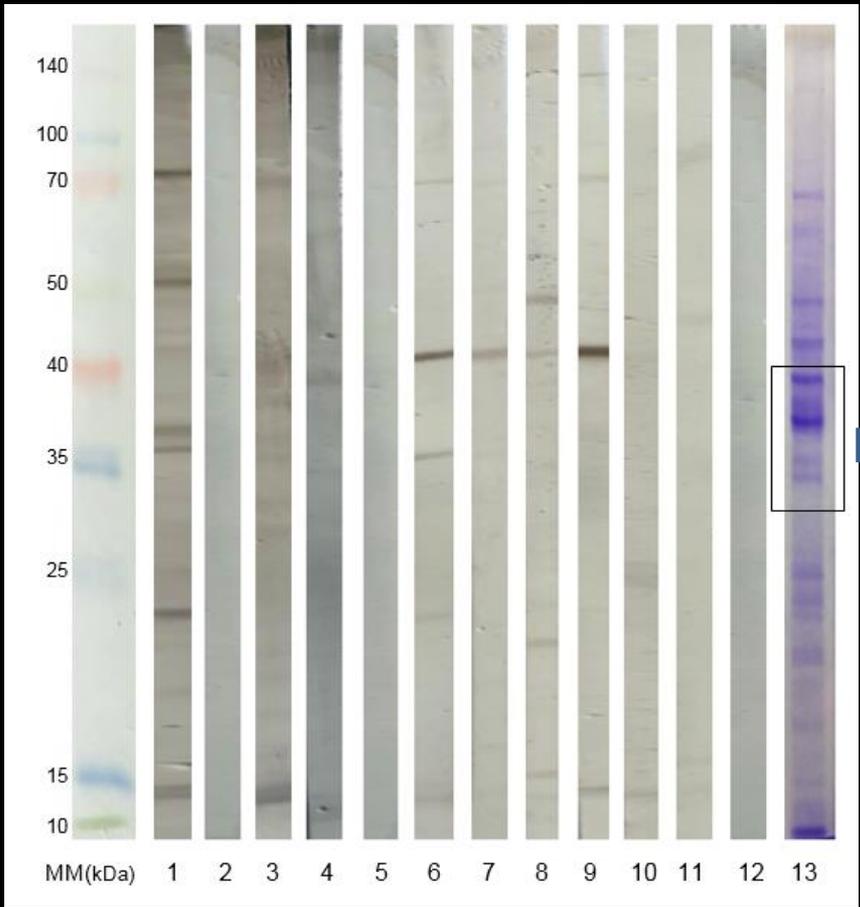
(8), ascariasis (9), taeniasis (10), gnathostomiasis (11), trichinellosis (12), capillariasis (13), fascioliasis (14) paragonimiasis (15), angiostrongyliasis (16) trichuriasis, and (17–18), individuals healthy control sera. Molecular mass markers are indicated on the left. The arrows indicate the protein (on the left) and immunoreactive bands (on the right) at approximately 26 and 29 kDa

# Identificação de proteínas Gel/WB 1D

Bandas (kDa)	Frações	
	Solúvel	Membrana
	TSL (%)	TML (%)
110	80	80
53-49	85	80
40-35	100	90
29-28	70	50
23-20	90	65
15-14	85	95
12-10	-	60

WB pool de soro

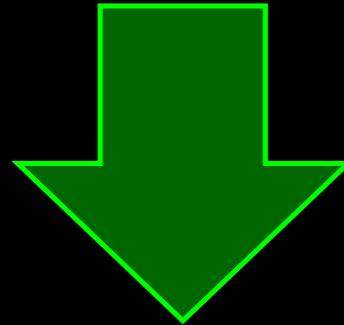
Antígeno solúvel –  
TSL





# Imunoproteômica

- Identificação de proteínas específicas identificadas por anticorpos.
- Associação com técnicas sorológicas.



Gel /WB e Espectrometria de massas

# Identificação de proteínas – TSL/ TML

Nº acesso	Descrição	MW [kDa]	Abundância* (%)
A0A090L6V9	Actina	41,8	63,5
A0A090KPU4	Galectina	31,4	3,93
A0A090KYR4	Glutamina sintetase (domínio catalítico)	40,3	3,07
A0A090MZE5	Malato desidrogenase	41,2	2,91
A0A090LM06	Catepsina	35,7	2,63
A0A090L778	Hemicetina	54,2	2,56
A0A090MMP9	Galectina	31,9	2,28
A0A090L1F4	Desidrogenase (mitocondrial, coenzima A)	34,1	2,09
A0A090LBJ7	Citrato sintase	49,0	1,63
A0A090LLS9	Imunoglobulina subtipo 2	36,3	1,49
A0A090LLA0	Integrina beta	53,1	1,17
A0A090MX65	Tropomiosina	39,1	1,18
A0A090L508	Fator de alongação 2	96,3	1,17
A0A090LQY6	Pirofosfato inorgânico	20,69	1,06

Nº acesso	Descrição	MW [kDa]	Abundância* (%)
A0A090L6V9	Actina	41,8	36,10
A0A090LTL1	Laminina	67,4	6,70
A0A090KTV2	Galectina	35,4	6,26
A0A090MYI6	Calponina	64,7	3,80
A0A090LKA7	Desidrogenase (mitocondrial)	35,0	3,57
A0A090LP37	Proteína não caracterizada	268,1	3,25
A0A090LG99	Calponina	42,6	2,97
A0A090LNQ1	Cadeia leve da miosina	227,2	2,74
A0A090MU21	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	36,6	2,52
A0A090KYR4	Glutamina sintetase (domínio catalítico)	40,3	2,34
H6ABX4	Tubulina beta	50,0	2,10
A0A090LDK1	Aldolase	39,5	2,02
A0A090MX65	Tropomiosina	39,1	2,00
A0A090LLS9	Imunoglobulina subtipo 2	36,3	1,84
A0A090L508	Fator de alongação 2	96,3	1,83
A0A090MRE4	Proteína de ligação a guanina (subunidade beta-4)	37,4	1,80
A0A090L4R3	Transporte de cálcio/potássio (ATPase, subunidade beta)	35,9	1,36
A0A090LG07	ATP sintase subunidade alfa	58,0	1,22
A0A090LL35	Aminotransferase	46,5	1,13
A0A090LDR7	ATP sintase subunidade beta	57,0	1,08

# Análise identificação proteica

- TSL: Metabolismo parasitário
- TML: Proteínas estruturais

# Análise identificação proteica

## Actina

- Proteína de maior abundância em células eucarióticas e altamente conservada;
- Apresenta muitas funções celulares incluindo:
  - Contração muscular
  - Motilidade celular
  - Divisão celular
  - Sinalização celular

(Fornélio et al., 1995; Bahia et al., 2006)

## Galectina

- Modulação da resposta immune;
- Reconhecimento imunológico.

(Vasta et al., 2009)

# Obrigado

marcelo.corral@usp.br