

## Otimização da recuperação de larvas filarioides de *S. Stercoralis* para obtenção de antígenos

### *Optimizing the recovery of infective larvae of S. Stercoralis to obtain antigen*

Elizabete de J. Inês<sup>1</sup>, Marcia Cristina Aquino Teixeira<sup>1</sup>, Neuza Maria Alcântara Neves<sup>2</sup>, Neci Matos Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia.

<sup>2</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

#### Resumo

O diagnóstico definitivo da strongiloidíase é realizado pela pesquisa de larvas nas fezes, utilizando-se principalmente o método de Baermann-Moraes, apesar da cultura em placa de ágar (CPA) apresentar maior sensibilidade. Além da finalidade diagnóstica, a CPA pode ser utilizada no cultivo das larvas de *Strongyloides stercoralis* para a produção de antígenos. Entretanto, as fezes têm muito detritos de alimentos e bactérias, o que prejudica a separação das larvas em uma suspensão limpa. O objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar o protocolo da recuperação das larvas filarioides de *S. stercoralis* das culturas em placas de ágar, comparando três métodos: (a) a lavagem das superfícies das placas de ágar com tampão fosfato-salina e (b) o método de Baermann-Moraes de todo o material contido nas placas (fezes e ágar) ou (c) somente com as fezes retiradas das placas, após o período de incubação das culturas. Além disso, foi avaliada a recuperação de larvas filarioides de culturas contendo estreptomicina e anfotericina. O procedimento de lavagem manual das superfícies das placas recuperou um número maior de larvas, quando comparado com os outros dois métodos ( $P < 0,05$ , Teste  $t$ ). O tempo ideal de incubação das culturas para a recuperação das larvas foram os três primeiros dias de incubação ( $P < 0,05$ ), enquanto que a maior quantidade de vermes adultos foi observada no quarto dia, porém sem significância estatística. A adição de antibiótico e antifúngico ao meio de cultura forneceu uma quantidade de larvas significativamente superior àquela das placas controle ( $P < 0,05$ ), sugerindo uma inibição parcial do desenvolvimento *in vitro* do *S. stercoralis* por bactérias e/ou fungos.

**Palavras-chave:** *Strongyloides stercoralis*. Strongiloidíase. Meios de Cultura.

#### Abstract

The definitive diagnosis of strongyloidiasis is performed by searching larvae in the feces, using mainly the method of Baermann-Moraes, despite the higher sensitivity of agar plate culture (APC). In addition to the diagnostic purpose, the APC can be used for cultivation of the *Strongyloides stercoralis* larvae to produce antigens. However, the stools have many food debris and bacteria, which hamper the separation of larvae in a clean suspension. The objective of this study was to improve the protocol of *S. stercoralis* infective larvae recovery from APC, by comparing three methods: (a) the washing of the agar plate surfaces with phosphate-buffered saline and (b) the method of Baermann-Moraes of the entire material of the plates (feces and agar) or (c) only with the feces removed from the plates, after the incubation period. Moreover, the recovery of the filarioid larvae from cultures containing streptomycin and amphotericin was evaluated. The procedure for manual washing of the plates surfaces recovered a greater number of larvae compared to the other two methods ( $P < 0.05$ ,  $t$  test). The optimal time of cultures incubation for the recovery of larvae was the first three days ( $P < 0.05$ ), while a higher number of adult worms was observed by the fourth day, although not statically significant ( $P > 0.05$ ). The addition of antibiotic and antifungal to the cultures medium provided a significantly higher number of larvae, when compared to the control plates ( $P < 0.05$ ), suggesting a partial inhibition of the *in vitro* development of *S. stercoralis* by bacteria and/or fungi.

**Keywords:** *Strongyloides stercoralis*. Strongyloidiasis. Culture Media.

### 1 INTRODUÇÃO

O *Strongyloides stercoralis* é um nematódeo classificado na ordem Rhabditida, família *Strongyloididae* e gênero *Strongyloides*. Nesse gênero, estão incluídas 52 espécies que são parasitos intestinais obrigatórios de muitos animais vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Campos et al. 2002). Estima-se que

em torno de 35 milhões de pessoas, em todo mundo, estejam infectadas, com prevalências mais elevadas nas regiões tropicais e subtropicais (KOTHBARY; MUSKIE; MATBUR, 1999; DE BONA; BASSO, 2008; OLSEN et al., 2009).

A infecção pelo *S. stercoralis*, em indivíduos imunocompetentes, geralmente cursa sem sintomas. No entanto, em indivíduos com a imunidade comprometida, a infecção pode ser fatal, devido à hiperinfecção e à disseminação da doença (KEISER; NUTMAN, 2004). O diagnóstico definitivo é realizado pela pesquisa das larvas nas fezes, utilizando-se o método de Baermann-Moraes. No entanto, a liberação das larvas de maneira intermitente torna esse método pouco sensível (DE KAMINSKY, 1993). O desenvolvimento

Recebido em 29/06/2012; revisado em 20/08/2012.

Correspondência / Correspondence: Secretaria do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: (55) (71) 3283-8959, Fax: (55) (71) 3283-8894. E-mail - ppgorgsistem@ufba.br

de testes mais sensíveis é de grande importância para auxiliar no diagnóstico da estrogiloidíase, principalmente nos pacientes mais suscetíveis à hiperinfecção e à disseminação da doença. Os métodos imunológicos têm sido pouco utilizados para o diagnóstico da estrogiloidíase, devido às dificuldades na produção e padronização de antígenos, principalmente a partir de larvas filarioides de *S. stercoralis*, pois depende da identificação de pacientes com hiperinfecção. Além do mais, a presença de bactérias e fungos nas fezes pode interferir na qualidade do antígeno. Outra característica dos antígenos brutos, utilizados para imunodiagnóstico, é a presença de reações cruzadas de IgG entre esses antígenos e antígenos de outros helmintos, principalmente em regiões endêmicas.

Para elevar a eficácia do diagnóstico imunológico das helmintíases, alguns estudos têm utilizado antígenos solúveis excretados ou secretados, frações glicoproteicas de diversos helmintos, além de antígenos recombinantes (RAVI et al., 2002; PAWLOWSKI et al., 2005b; NEVES et al., 2008; DEMERDASH et al., 2011; SYKES et al., 2011). Em um estudo realizado em nosso laboratório, a oxidação dos epitopos glicosilados pelo metaperiodato de sódio demonstrou que os carboidratos do antígeno de *S. stercoralis* são importantes para o reconhecimento de anticorpos das classes de IgG e IgE (INÊS et al., 2011). Vários estudos vêm utilizando *Strongyloides venezuelensis* (RODRIGUES; VICENTE; GOMES, 1985) e *S. ratti* (SANDGROUD, 1925) como modelos experimentais para a produção de antígenos, devido às suas similaridades antigênicas com o *S. stercoralis*. A utilização desses modelos permite a obtenção de grandes quantidades de larvas filarioides para a produção de antígenos e não representa risco para seus manipuladores (SATO et al., 1990; TAKAMURE, 1995; BAEK et al., 2003; FERREIRA et al., 2007). Por outro lado, os imunoenaios com antígeno de *S. stercoralis* apresentam maior sensibilidade e especificidade (CONWAY et al., 1993).

Dessa forma, a modificação de protocolos para melhorar a obtenção de larvas filarioides de *S. Stercoralis*, tanto de modo qualitativo quanto quantitativo, é de grande relevância para a obtenção de antígenos mais purificados, o que, conseqüentemente, pode elevar a sensibilidade e a especificidade dos ensaios imunológicos para diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*.

Este trabalho teve como objetivo aperfeiçoar o protocolo da recuperação das larvas de *S. stercoralis* das culturas em placas de ágar, comparando três métodos: a) a lavagem das superfícies das placas com tampão fosfato-salina; b) método de Baermann-Moraes de todo o material contido nas placas (fezes e ágar); c) método de Baermann-Moraes somente das fezes retiradas das placas, após o período de incubação.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal da Bahia, para avaliar novos protocolos para recuperação das larvas de acordo com os itens descritos abaixo.

### 2.1 Cultura em placas de ágar

As amostras fecais de pacientes hiperinfetados com *S. stercoralis* foram semeadas em placas de ágar, segundo Arakaki e colaboradores (1990). Resumidamente, a cada placa de Petri (diâmetro de 8,5 cm e profundidade de 1,5 cm) foram adicionados 5 ml do meio de cultivo estéril com 1,5% de ágar nutriente, 1% de extrato de bife, 1% de peptona e 5% de cloreto de sódio. Posteriormente, 3g de fezes foram semeadas no centro de cada placa. As placas foram seladas com fita adesiva, para evitar a saída das larvas filarioides (KOGA et al., 1991) e incubadas a 32°C durante 5 dias.

### 2.2 Recuperação das larvas filarioides do cultivo em placa de ágar

As larvas foram cultivadas em placas de ágar, como descrito no item 2.1, e recuperadas através de três protocolos: 1) a partir da lavagem das superfícies das placas com tampão fosfato-salina 0,15M, pH 7,2 (PBS); 2) utilizando-se o método de Baermann-Moraes de todo o material contido nas placas (fezes e ágar); 3) utilizando-se somente as fezes retiradas das placas, através do método de Baermann-Moraes. Após recuperação, as larvas foram lavadas 5 vezes com PBS, por centrifugações a 1200g por 7 min, a 4°C. Os sedimentos com as larvas foram ressuspensos em 15 ml de hipoclorito de sódio a 0,25% e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, os parasitos (larvas e vermes adultos) foram lavados por mais 5 vezes, como na etapa anterior, e quantificados através da microscopia óptica, em câmara de Neubauer.

### 2.3 Avaliação do crescimento das larvas de *S. stercoralis* na presença de antifúngico e antibiótico

A avaliação do crescimento das larvas foi realizada pela semeadura de fezes de um paciente com infecção com *S. stercoralis* em 10 culturas em placas de ágar, com sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL). Para controle, foram utilizadas 10 placas com meio base, sem antibiótico e antifúngico. Após a semeadura, as culturas foram processadas segundo o item 2.1 e a recuperação das larvas foi realizada utilizando o método de lavagem da superfície das placas.

### 2.4 Resultados

Para a realização do imunodiagnóstico da estrogiloidíase, a produção de um antígeno mais puro e em quantidade suficiente para realização dos ensaios é indispensável para obtenção de resultados confiáveis. Neste trabalho, foram investigados diferentes métodos de recuperação das larvas filarioides de *S. Stercoralis*, visando à produção de antígeno. O procedimento de lavagem manual com pipeta Pasteur foi o método que recuperou o maior número de larvas, quando comparado com a recuperação das larvas, utilizando-se o método de Baermann-Moraes de todo o material contido nas placas (gel e fezes) ou somente das fezes retiradas das culturas ( $P < 0,05$ , *Teste t*) (Tabela 1). Dentre os três protocolos de obtenção das larvas filarioides, o que apresentou maior resíduo fecal foi o método de lavagem manual com pipeta de Pasteur. Com

relação ao tempo ideal de incubação das culturas para a recuperação das larvas filarioides, o número de larvas filarioides foi maior nos três primeiros dias ( $P < 0,05$ ) e a maior quantidade de vermes adultos foi observada no quarto dia, embora este último aumento não tenha sido significativo ( $P > 0,05$ , Tabela 1). No quarto dia, o número de larvas filarioides recuperadas foi reduzido nos três protocolos e foi observada uma maior quantidade de vermes adultos, porém, esta diferença não foi significativa ( $P > 0,05$ , Tabela 1).

A Tabela 2 mostra que a quantidade de larvas foi significativamente superior no meio onde foram adicionadas a estreptomicina e a anfotericina, quando comparada com a do controle ( $P < 0,05$ )

### 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as quantidades de larvas obtidas em relação aos dias e meios de cultura com ou sem antibióticos e antifúngicos, foram analisadas através do teste de T de Student. Valores de p menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

### 4 DISCUSSÃO

O extrato antigênico de *S. stercoralis*, resultante das larvas obtidas de cultivo em placa de ágar, tem sido utilizado em técnicas sorológicas. No entanto, esses extratos não têm adequada especificidade, pois

representam o extrato bruto do parasito com antígenos comuns a outros helmintos. Estudos demonstram resultados falso-positivos causados pela reação cruzada com antígenos de outros nematoides, como, por exemplo, ancilostomídeos e filariídeos (CONWAY et al., 1993; SITHITHAWORN et al., 2003), além da limitação de recuperar quantidade de larvas suficiente para a produção do antígeno (SUDRÉ, 2006).

Uma alternativa é a utilização de antígenos heterólogos, originados de larvas de outras espécies de *Strongyloides*, principalmente *S. ratti* e *S. venezuelensis*, devido às suas similaridades antigênicas com o *Strongyloides stercoralis* e à maior facilidade de obtenção das larvas em infecção experimental (COSTA-CRUZ et al., 2003; SILVA et al., 2003; MACHADO et al., 2003; SUDRÉ, 2006). Entretanto, Gam, Neva e Krotoski (1987) e Lindo e colaboradores (1994) relataram que a utilização de antígenos de *S. stercoralis* apresenta uma melhor sensibilidade quando comparada à dos antígenos de *S. ratti* ou *S. venezuelensis* no diagnóstico da infecção através do ELISA. Desta forma, é necessário uma melhor comparação entre os componentes antigênicos imunodominantes dessas duas espécies de *Strongyloides* com *S. stercoralis*, visando a se obter antígenos heterólogos que possibilitem ensaios de maior sensibilidade para diagnóstico da strongiloidíase humana (SILVA, 2003).

Tabela 1 – Comparação entre os protocolos para recuperar as larvas de *S. stercoralis* da cultura em placa de ágar e influência do tempo de incubação

Tempo	Protocolos para recuperação das larvas de <i>S. stercoralis</i> das culturas em placas de ágar						#Valor de p
	Lavagem manual		Baermann-Moraes do gel e das fezes		Baermann-Moraes do gel		
	Modificação dos métodos						
	*LV	**VA	*LV	*VA	*LV	*VA	
1º dia	384	1	69	-	70	-	$P < 0,05$
2º dia	201	4	73	-	54	-	$P < 0,05$
3º dia	505	5	130	3	19	-	$P < 0,05$
4º dia	210	8	62	4	16	-	$P < 0,05$

Legenda: \*Lv Larvas filarioides, \*\*VA Vermes adultos; #Teste de T de Student

Fonte: Elaboração das autoras.

Tabela 2 – Média do número de larvas *S. stercoralis* e vermes adultos recuperadas de dez culturas em placa de ágar utilizando o método de lavagem da placa.

Meio de cultura	*Larvas. mL <sup>-1</sup>	*Vermes adultos. mL <sup>-1</sup>
Ágar convencional	930	570
Ágar convencional com estreptomicina e anfotericina B	1800	150

Legenda : \*  $P < 0,05$ ; Test e T de Student

Fonte: Elaboração das autoras.

Além das reações cruzadas, a presença de bactérias e resíduos fecais, observada na suspensão de larvas de *S.stercoralis* recuperadas através das lavagens das placas de ágar, pode interferir na qualidade do antígeno. Estudos demonstram a possibilidade de utilização dos padrões de migração deixados pelas larvas na placa de ágar para realizar o diagnóstico diferencial entre as espécies do *S. stercoralis* e dos ancilostomídeos. Nas culturas em placas de ágar, as larvas dos nematódeos deixam caminhos facilmente visíveis a olho nu, devido à presença de colônias de bactérias que formam padrões ondulatórios no ágar, e, quando visualizados ao microscópio, demonstram que as larvas apresentam diferentes trajetórias de migração no gel: para os ancilostomídeos, o movimento é serpentiforme e para o *S. stercoralis*, é em forma de chicote (JONGWUTIWES et al., 1999; INÊS et al. 2011). A presença de bactérias transportadas na cutícula das larvas é importante para o diagnóstico por meio dos caminhos. Contrariamente, para a recuperação de larvas para a produção de antígenos, a presença de bactérias interfere na pureza do extrato antigênico (LIU; HSU; CHANG, 2009).

Dessa forma, utilizando antibiótico adicionado ao meio de cultura para o cultivo de *S.stercoralis* em placa de ágar, obtivemos resultados favoráveis em relação à limpeza do antígeno e melhor recuperação das larvas. Provavelmente, isso ocorreu em virtude da utilização de um antibiótico com espectro amplo para Gram negativos e positivos, além da escolha do antifúngico usado no tratamento contra fungos comensais, presentes nas amostras fecais. Esses fármacos influenciaram apenas no crescimento bacteriano e fúngico, permitindo o crescimento e recuperação das larvas do helminto. Arakaki e colaboradores (1990), em estudo com *S. stercoralis*, visando a minimizar a contaminação por bactérias, realizou centrifugação em gradiente de densidade da suspensão de larvas; no entanto, não existem outros trabalhos mostrando a utilização de fármacos na cultura em placa de ágar para posterior recuperação de larvas. Uma possibilidade a ser testada para a redução da quantidade de detritos é a lavagem da suspensão de larvas em filtros de poliestireno, permeáveis a bactérias e a outros detritos e não a larvas.

No presente estudo, foi observado que, no terceiro dia de incubação das culturas, obteve-se maior quantidade de larvas e, no quinto dia, maior quantidade de vermes adultos. Portanto, para a produção de antígeno apenas com larvas filarioides de *S. stercoralis*, as culturas devem ser incubadas por 72 horas. A presença de vermes adultos nos extratos antigênicos deve ser avaliada, uma vez que não existem relatos comparando ensaios sorológicos, utilizando antígenos produzidos a partir de larvas filarioides com vermes adultos. Para a produção de antígenos, foi avaliada a recuperação das larvas de *S. stercoralis* por meio da lavagem manual da placa de ágar e do método Baermann Moraes, utilizando-se todo o material da placa (fezes e gel) ou utilizando-se apenas o gel. A recuperação das larvas infectantes foi maior nos dois primeiros métodos. Estes achados estão de acordo com Inês e colaboradores, (2011), em que demonstrou que

cerca de 10% do total de larvas filarioides obtidas com a lavagem das placas ficam presas no gel e podem ser recuperadas por meio do Baermann-Moraes.

Este trabalho demonstrou que a otimização da técnica de recuperação de larvas para a produção de um antígeno mais puro pode possibilitar maior especificidade dos ensaios sorológicos em que se utilizam essas larvas como antígeno.

## REFERÊNCIA

- ARAKAKI, T. et al. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 76, n. 3, p. 425-428, 1990.
- BAEK, B. K. et al. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Vet. Parasitol.**, Lawrence, v. 113, n.3-4, p. 217-227, 2003.
- CAMPOS, Dulcinea M. B. *Strongyloides cebus* Darling, 1911. Confirmação de espécie. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v. 14, n. 2, p. 173-219, 1985.
- CONWAY, D. J. et al. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 87, n. 2, p. 173-176, 1993.
- COSTA-CRUZ, J. M. et al. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 265-268, 2003.
- DE BONA, S.; BASSO, R. M. C. Hyperinfection by *Strongyloides stercoralis* associated with chronic use of corticosteroid. **Rev.Bras. Anal. Clin.**, v. 40, n. 4, p. 247-250, 2008.
- DE KAMINSKY, Rina G. de. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 79, n. 2, p. 277-280, 1993.
- DEMERDASH, Z. A. et al. Diagnostic efficacy of monoclonal antibody based Influence of infection with sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Fasciola gigantica* excretory/secretory antigens in both serum and stool. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, p. 176, 2011.
- FERREIRA, C. M. et al. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes Infect.**, Paris, v. 9, n. 7, p. 813-820, 2007.
- GAM, A. A.; NEVA, F. A.; KROTOSKI, W. A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 157-161, 1987.
- INÊS, Elizabethete de J. **Avaliação de métodos parasitológicos e imunológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase**. 72 f., 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 2011.
- INÊS, E.de J.et al. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Trop.**,Basel, v. 120, n. 3, p.206-210, 2011.
- JONGWUTIWES, S. et al. Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 93, n. 4, p. 398-400, 1999.
- KEISER, Paul B.; NUTMAN, Thomas B. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 17, n. 1, p. 208-217, 2004.
- KOGA, K. et al. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 518-521, 1991.
- KOTHBARY, N. N.; MUSKIE, J. M.; MATBUR, S. C. Residents' Teaching Files: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **RadioGraphics**, Illinois v. 19, p. 1077-1081, 1999.

- LINDO, J. F. et al. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 175-179, 1994.
- LIU, H. C.; HSU, J. Y.; CHANG, K. M. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection presenting with symptoms mimicking acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. **J. Chin. Med. Assoc.**, Taipei, v. 72, n. 8, p. 442-445, Aug. 2009.
- MACHADO, E. R et al. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 849-851, 2003.
- NEVES, N. M. A. et al. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 119, n. 3, p. 349-351, 2008.
- OLSEN, A. et al. Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 103, n. 10, p. 967-972, 2009.
- PAWLOWSKI, Z. S. et al. Control Measures for taeniosis and cysticercosis. In: MURRELL, K.D. (Ed.), **WHO/FAO/OIE guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis//cysticercosis**. Paris: OIE, 2005. p. 73-92.
- RAVI, V. et al. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 73-81, 2002.
- RODRIGUES, H. O.; VICENTE, J. J.; GOMES, D. C. *Strongyloides ferreirai* sp. n. (Nematoda, Rhabdiasoidea) parasito do roedor Kerodon rupestris (Wied.) no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 407-410, 1985.
- SANDGROUND, J. H. Speciation and specificity in the Nematoda genus *Strongyloides*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 12, n. 2, p. 59-82, 1925.
- SATO, Y. et al. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 84, n. 3, p. 403-406, 1990.
- SILVA, L. P. et al. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 687-691, 2003.
- SITHITHAWORN, P. et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 97, n. 4, p. 398-402, 2003.
- SUDRÉ, A. P. et al. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Rev. Pat. Trop.**, Goiania, v. 35, n. 3, p. 173-184, 2006.
- SYKES, Alex M.; MCCARTHY, James S. A Coproantigen Diagnostic Test for *Strongyloides* Infection. **Clin. Trop. Med. Lab.**, Herston, v. 5, n. 2, p. 955, 2011.
- TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 25, n. 8, p. 907-911, 1995.