

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**  
**Programa de Pós Graduação em**  
**Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

MON  
616.295.133.2  
S586W  
TES/MEH

**“WESTERN BLOTTING” UTILIZANDO ANTÍGENO DE**  
***Strongyloides ratti* NA DETECÇÃO DE IgG SÉRICA NA**  
**ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

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

**Luciana Pereira Silva**

**SISBI/UFU**



1000204854

**UBERLÂNDIA - M.G.**  
**Dezembro – 2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**  
**Programa de Pós Graduação em**  
**Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**“WESTERN BLOTTING” UTILIZANDO ANTÍGENO DE**  
***Strongyloides ratti* NA DETECÇÃO DE IgG SÉRICA NA**  
**ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

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

**Luciana Pereira Silva**  
Mestranda

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Julia Maria Costa Cruz**  
Orientadora

UBERLÂNDIA - M.G.  
Dezembro - 2000

**NUNCA SEREI SUFICIENTEMENTE GRATA:**

A **Deus** por haver iluminado meu espírito pelo caminho da vida eterna,  
inspirando as decisões coerentes a serem seguidas.

Ao meu marido **Regildo Márcio**, companheiro e estimulador em todos os  
momentos da minha vida.

A meus pais, **Maria das Graças** e **Amélio** pela oportunidade de estudar.

## AGRADECIMENTOS

Somos uma somatória de tudo que nós aprendemos de todos aqueles - grandes ou pequenos - que nos ensinam. Eu sou grata pela inspiração e sabedoria dos homens e mulheres que me acompanharam durante esta caminhada enviados por DEUS e pelas fontes e raízes de sabedoria transgeracionais que eles me deixaram.

No próprio desenvolvimento e produção deste trabalho, eu sinto uma imensa gratidão a:

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Julia Maria Costa Cruz cuja profissionalidade me inspirou a continuar a cumprir meu propósito, orientando e contribuindo para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia pela paciência, auxílio e compreensão na realização da metodologia; em especial à Maria do Rosário F. Gonçalves Pires e Msc. Ivanildes Solange da Costa Barcelos, que acompanharam e ensinaram com carinho, paciência e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dulcinea Maria Barbosa Campos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, por conceder larvas de *Strongyloides ratti* por meio de intercâmbio científico.

Ao Prof. Dr. Foued S. Espindola e a Bióloga Andreia Barcelos Passos Lima, que possibilitaram a realização de parte deste trabalho no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia e o Prof. Dr. Wanderley Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela ampliação em clareza e coerência deste trabalho.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, João Martins Neto pela competência e auxílio em todos os momentos.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização deste trabalho.

E, sobretudo à Deus.

*Obrigada.*

Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Profª Drª Julia Maria Costa Cruz.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituição:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Universidade Federal de Uberlândia

“Na luta do homem contra os parasitos, o homem ganha as batalhas e os parasitos vencem a guerra, ocultos pelo descaso das autoridades e camuflados na miséria, na ignorância e no abatimento moral de um povo”.

(Pedro Marcos Linardi)

## RESUMO

A estrogiloidíase humana é uma doença parasitária cosmopolita que ocupa o quinto lugar dentre as helmintíases com estimativa de mais de 50 milhões de pessoas infectadas. O modelo animal com *Strongyloides ratti* viabiliza a produção de larvas filarióides em laboratório permitindo o desenvolvimento de ensaios biológicos. Este trabalho teve como objetivo utilizar o teste "Western blotting" (WB) em amostras de soro empregando-se extrato salino de *S. ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana comparando-o com os testes de Imunofluorescência Indireta (I.F.I.) e Enzime-Linked immunosorbent Assay (ELISA). Foram analisadas 180 amostras de soro, sendo 80 de pacientes que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes, 60 de pacientes com outras parasitoses e 40 de indivíduos sadios. *S. ratti* foi obtido de cultura de fezes de *Rattus rattus* infectados experimentalmente. Anticorpos IgG séricos foram detectados pelo teste I.F.I. utilizando-se como antígeno cortes de 4 micras de larvas filarióides de *S. ratti*. Para os testes ELISA e WB utilizou-se como antígeno extrato salino de larvas filarióides de *S. ratti*. O WB foi realizado com gamaglobulina de coelho imune e amostras de soro dos pacientes. Foram considerados imunodominantes os marcadores antigênicos: 8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 46, 55, 60, 70, 78, 81, 85, 90, 105, 117, 126 e 138 kDa. O reconhecimento de duas ou mais proteínas imunodominantes pelas amostras de soro dos indivíduos estudados foi utilizado como critério de positividade para o teste de WB. Os peptídeos imunodominantes (14, 17, 20, 30, 35, 55 e 78 kDa) foram reconhecidos pela gamaglobulina de coelho imune e coincidiram com os peptídeos imunodominantes detectados pelas amostras de soro dos pacientes com estrogiloidíase. Ocorreram reações cruzadas com ancilostomídeo (2 casos) e *Trichuris trichiura* (1 caso). As sensibilidades e as especificidades dos testes I.F.I., ELISA e WB foram, 90%, 100%, 98,7% e 100%, 98% e 93%, respectivamente. Houve concordância positiva para os três testes em 90% dos casos com estrogiloidíase. A concordância negativa nos três testes foi de 91,7% e 95%, respectivamente para os pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios. Nos casos com resultados de I.F.I.- e ELISA+, o WB definiu o diagnóstico. Comparando-se os três testes não houveram outras possibilidades discordantes além das citadas acima. Conclui-se que o WB utilizando extrato salino de *S. ratti* foi capaz de reconhecer 22 peptídeos imunodominantes e definiu o diagnóstico em casos de sorologia discordantes (I.F.I.-/ELISA+) além de apresentar índices elevados tanto em sensibilidade quanto em especificidade nos testes I.F.I., ELISA e o WB analisados na detecção de IgG sérica no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

## SUMMARY

Human strongyloidiasis is a cosmopolitan parasitic disease that occupies the fifth position between helminthiasis and it is estimated that more than 50 million people are infected. The animal model for *Strongyloides ratti* turns the filariform larvae production viable at laboratory, allowing development of biological assay. The present study aimed to utilize Western Blotting test (WB) in serum samples with saline extract from *S. ratti* in the diagnosis of human strongyloidiasis and to compare with Immunofluorescence Assay Test (IFAT) and Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA). From 180 serum samples analysed, 80 were from patients that were eliminating *S. stercoralis* larvae in feces, 60 were from patients with another parasitosis and 40 were from healthy individual. *S. ratti* was obtained from feces culture of *Rattus rattus* experimentally infected. IgG antibodies seric from serum were detected through IFAT, utilizing *S. ratti* filariform larvae sections of 4 micra as antigen. Saline extract from *S. ratti* filariform larvae was utilized as antigen for ELISA and WB tests. WB was carried out with gammaglobulin from immunized rabbit and the samples of patient serum. The following antigenic markers were considered immunodominant: 8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 46, 55, 60, 70, 78, 81, 85, 90, 105, 117, 126 and 138 kDa. The recognition of two or more immunodominant proteins by serum samples from the studied individual was the criterion of positivity for WB test. The immunodominant peptides (14, 17, 20, 30, 35, 55 and 78 kDa) were recognized by gammaglobulin from immunized rabbit and they were coincident with the immunodominant peptides detected by samples of serum from patients with strongyloidiasis. Cross-reactions occurred with hookworms (2 cases) and *Trichuris trichiura* (1 case). Sensitivity and specificity of IFAT, ELISA and WB tests were 90%, 100%, 98.7% and 100%, 98%, 93% respectively. There was a positive concordance for the three tests in 90% of the cases of strongyloidiasis. The negative concordance in the three tests was 91.7% and 95% respectively, for the patients with another parasitosis and for healthy individual. In cases of negative IFAT and positive ELISA results, diagnosis was defined by WB. By comparing the three tests there were no other contradictory possibilities apart from that above cited. In conclusion, WB test utilizing saline extract of *S. ratti* was able to recognize 22 immunodominant peptides and defined the diagnosis in cases of contradictory serology (IFAT-/ELISA+) and also presents high levels of sensitivity as well specificity in IFAT, ELISA and WB tests analysed for seric IgG detection in the diagnosis of human strongyloidiasis.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Histórico e Classificação taxonômica .....	1
1.2 Aspectos Biológicos.....	2
1.3 Epidemiologia .....	3
1.4 Aspectos Clínicos.....	5
1.5 Resposta imune na estrogiloidíase .....	6
1.6 Diagnóstico .....	7
1.6.1 Diagnóstico parasitológico .....	8
1.6.2 Diagnóstico imunológico .....	9
1.7 Antígeno Heterólogo .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1 Aspectos éticos .....	18
3.2 Obtenção de <i>Strongyloides ratti</i> .....	18
3.2.1 Método de Looss .....	18
3.2.2 Método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) .....	19
3.3 Produção de antígenos de <i>S. ratti</i> .....	19
3.3.1 Para o teste de Imunofluorescência Indireta .....	19
3.3.2 Para ELISA e "Western blotting" (extrato salino) .....	20
3.4 Obtenção das amostras de soro .....	20
3.4.1 Amostra de soro padrão positivo e negativo .....	20
3.5 Produção do soro imune .....	21
3.6 Obtenção de gamaglobulina imune .....	21
3.7 Teste de Imunofluorescência Indireta (I.F.I.) .....	22
3.8 Teste ELISA .....	22
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS a 12% (SDS-PAGE) para realização do teste de "Western blotting" .....	23
3.10 Titulação do conjugado de cabra anti-IgG humana peroxidase pelo teste ELISA para a aplicação do teste "Western blotting" .....	25
3.11 Teste de "Western blotting" .....	25
3.11.1 Coloração do gel .....	26
3.12 Análise estatística .....	27
3.13 Normas de biossegurança .....	27
4. RESULTADOS .....	28
4.1 Obtenção de <i>Strongyloides ratti</i> .....	28
4.2 Produção de antígenos .....	28
4.2.1 Para Imunofluorescência Indireta .....	28
4.2.2 Para testes ELISA e "Western blotting" .....	28
4.3 Identificação das amostras de soros testadas .....	28
4.4 Teste de "Western blotting" .....	33
4.5 Avaliação do teste "Western blotting" .....	35
4.5.1 Avaliação da especificidade do extrato antigênico .....	35
4.6 Comparações entre os testes I.F.I., ELISA e "Western blotting" na detecção de IgG anti- <i>S. stercoralis</i> utilizando extrato salino de <i>S. ratti</i> em amostras de soro .....	41
5. DISCUSSÃO .....	43
6. CONCLUSÕES .....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

# 1. INTRODUÇÃO

Na competição dos parasitos, onde sobreviver em alguns nichos ecológicos torna-se indispensável a presença do hospedeiro adequado, *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) ocupa uma posição única. Este nematódeo tem desenvolvido uma relação com sucesso em dois ecossistemas, o meio terrestre e o corpo do mamífero, facultativamente independente entre eles. Este parasito infecta os seres humanos, mas pode atingir também macacos, cães, gatos e roedores (GENTA, 1986; GROVE, 1996).

## 1.1 Histórico e Classificação Taxonômica

*Strongyloides stercoralis* é o agente etiológico da estrongiloidíase humana. Este nematódeo foi observado pelo médico francês Louis Normand em 1876, na cidade de Toulon-França, ao examinar fezes diarréicas de soldados franceses procedentes da Cochinchina, antigo Vietnã. Bavay, farmacêutico e colaborador de Normand, classificou as formas parasitas como *Anguillula stercoralis* (latim "Anguillula" = pequena enguia ou peixe longo e "stercus" = esterco) encontradas na luz intestinal e como *A. intestinalis* para os obtidos em necropsias. Em 1911, Leuckart demonstrou serem as formas *stercoralis* e *intestinalis* pertencentes à mesma espécie heterogenética, com uma forma parasita partenogenética e outra de geração de vida livre bissexuada, passando a denominá-la *Strongyloides stercoralis* (grego "Strongylos" = arredondado ou esférico) (PESSOA, MARTINS, 1982; PIRES, DREYER, 1993; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2000).

O nematódeo *Strongyloides* sp., pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, subclasse Rhabditia, ordem Rhabditida. A família Strongyloididae contém apenas um gênero *Strongyloides* (LEVINE, 1980) composto por 52 espécies dentre as quais somente duas acometem o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni* von Linstow, 1905 esta última apresenta uma subespécie *S. f. kellyi*. A primeira espécie tem

distribuição mundial, a segunda é encontrada na África e nas Filipinas e a subespécie foi encontrada parasitando crianças na Papúa Nova Guiné (BARNISH, ASHFORD, 1989; PIRES, DREYER, 1993).

## 1.2 Aspectos Biológicos

As fêmeas partenogenéticas localizam-se na parede do intestino delgado, mergulhadas nas criptas da mucosa duodenal, principalmente nas glândulas de Lieberkühn e na porção superior do jejuno, onde fazem as posturas onde os ovos saem do intestino para o solo. Nas formas graves, são encontradas da porção pilórica do estômago até o intestino grosso (COSTA-CRUZ, 2000).

As larvas rabditóides, eliminadas nas fezes do indivíduo parasitado, podem seguir dois ciclos: o direto ou partenogenético e o indireto, sexuado ou de vida livre, ambos monoxênicos. Isto ocorre devido à constituição genética das fêmeas partenogenéticas, que são triplóides ( $3n$ ) e podem produzir, simultaneamente, três tipos de ovos, originando larvas rabditóides: triplóides ( $3n$ ) que se transformam em larvas filarióides triplóides infectantes, completando o ciclo direto; diplóides ( $2n$ ), que originam fêmeas de vida livre; e haplóides ( $n$ ), que evoluem para macho de vida livre, sendo que estas duas últimas completam o ciclo indireto (COSTA-CRUZ, 2000).

No ciclo direto, as larvas do primeiro estágio ou larvas rabditóides (L1) no solo ou sobre a pele da região perineal, após 24 a 72 horas, se transformam em larvas infectantes (L3). Ocorrem quatro mudas ou ecdises larvárias, sendo que as duas primeiras (L1→L2→L3) ocorrem no solo, e as duas últimas (L3→L4→fêmea parasita) no intestino do hospedeiro. No ciclo indireto as larvas rabditóides sofrem quatro mudas larvárias no solo e, após 18 a 24 horas, produzem fêmeas e machos de vida livre (COSTA-CRUZ, 2000).

Os ciclos direto e indireto se completam pela penetração ativa das larvas L3 na pele ou mucosa oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro. Estas larvas secretam melanoproteases, que

as auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos, que ocorre numa velocidade de 10cm por hora. Algumas morrem no local, mas o ciclo continua através das larvas que atingem a circulação venosa e linfática e através destes vasos seguem para o coração e os pulmões. Chegam aos capilares pulmonares, onde se transformam em L4, atravessam a membrana alveolar e, através de migração pela árvore brônquica, chegam à faringe. Podem ser expelidas pela expectoração, que provocam, ou serem deglutidas, atingindo o intestino delgado, onde se transformam em fêmeas partenogênicas. Os ovos são depositados na mucosa intestinal e as larvas alcançam a luz intestinal (COSTA-CRUZ, 2000).

A infecção no homem ocorre, na maioria das vezes, através da penetração ativa das larvas filarióides na pele (hetero ou primoinfecção), principalmente nos membros inferiores e ocasionalmente através da ingestão de água ou alimentos contaminados (FERREIRA, 1991; COSTA-CRUZ, 2000).

No homem ocorre ainda a auto-infecção, que pode acontecer de duas formas, interna e externa. Na auto-infecção interna, as larvas rabditóides, ainda na luz intestinal, transformam-se em larvas filarióides, penetrando na mucosa e completam o ciclo pulmonar. Na auto-infecção externa, as larvas filarióides, resultantes da evolução de larvas rabditóides presentes na região perianal, penetram ativamente na pele e completam o ciclo direto. Como resultado da autoinfecção contínua, a estrogiloidíase pode persistir por muitas décadas após o indivíduo ter sido infectado, mesmo na ausência de novas infecções (BRASITUS *et al.*, 1980; REY, 1992; LIU, WELLER, 1993; ROSSI *et al.*, 1993a; CONWAY *et al.*, 1995).

### 1.3 Epidemiologia

A estrogiloidíase humana é uma doença parasitária cosmopolita que ocupa o quinto lugar de prevalência dentre as helmintíases, com estimativa de mais de 50 milhões de pessoas infectadas. *S. stercoralis* apresenta-se amplamente disseminado nos trópicos e subtropicais, sendo que as condições climáticas favoráveis, a alta concentração populacional de baixo

poder econômico e cultural, a deficiência de educação sanitária e a falta de saneamento básico permitem o desenvolvimento e a manutenção deste agente no meio ambiente. Ocorre também em residentes e migrantes de países desenvolvidos, viajantes e veteranos retornados de áreas endêmicas, nativos e residentes nos EUA (CROMPTON, 1987; CELEDON *et al.*, 1994; AL SAMMAN, SALIMA, LONG, 1999).

De acordo com a prevalência da infecção, STUERCHLER (1981) definiu três regiões mundiais: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). A estrogiloidíase apresenta uma distribuição heterogênea com áreas de predileção no Sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África e algumas ilhas do Caribe (IN: PIRES, DREYER, 1993).

Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham na zona rural, enquanto que nos países tropicais a doença acomete principalmente crianças pelo seu contato freqüente com solos contaminados (BOUREE *et al.*, 1981; PIRES, DREYER, 1993).

No Brasil, a importância deste parasito como agente etiológico da estrogiloidíase foi estudada primeiramente por Ribeiro da Luz, em 1880. A partir de então, as maiores taxas de prevalência foram encontradas nos Estados de Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (FERREIRA, 1991; PIRES, DREYER, 1993; ANDRADE NETO, ASSEF, 1996; MACHADO, COSTA-CRUZ, 1998; COSTA-CRUZ, 2000).

Analisando 9900 lâminas pelos métodos parasitológicos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (LUTZ, 1919), MACHADO, COSTA-CRUZ (1998) demonstraram que Uberlândia-MG-Brasil é uma região hiperendêmica, ao registrarem um índice de 13% de ocorrência para a infecção por *S. stercoralis* em crianças de quatro meses a sete anos de idade, residentes da área urbana.

## 1.4 Aspectos Clínicos

As características clínicas desta geo-helmintíase estão ligadas a diversos fatores como: migração do parasito no organismo do hospedeiro, sensibilidade imunológica, grau da infecção parasitária, estado nutricional do hospedeiro e estados infecciosos concomitantes. Uma vez que a estrogiloidíase é assintomática ou produz sintomas pulmonares e digestivos comuns a outras doenças parasitárias, o diagnóstico clínico ainda é inconclusivo (REY, 1992; LIU, WELLER, 1993).

A triagem clássica para um indivíduo com suspeita de estrogiloidíase ocorre quando o mesmo apresenta diarreia, dores abdominais, urticárias e, além destas manifestações, eosinofilia sangüínea. Em geral, nos indivíduos imunologicamente normais, a estrogiloidíase é assintomática ou oligossintomática. A presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado resulta em reação inflamatória, que pode levar a ulcerações extensas, conduzindo à má absorção, perda protéica intestinal e diarreia crônica ou provocar disfunção gastrointestinal, manifestada como dor abdominal ou hemorragia (REY, 1992; GROVE, 1996; MANNESCHI *et al.*, 2000).

A estrogiloidíase disseminada fatal foi constatada por NOLETO *et al.* (1990) em 13 casos de necropsias, com idade entre 11 e 64 anos, realizados no Rio de Janeiro (RJ). Todos os indivíduos estudados apresentavam uma condição desencadeante prévia: desnutrição crônica, uso de corticosteróides, infecção respiratória aguda ou síndrome de Cushing.

Indivíduos com deficiência de imunidade celular podem desenvolver um ciclo vital de auto-infecção. Nos hospedeiros imunossuprimidos, seja por neoplasias hematológicas, alcoolismo crônico, desnutrição protéico-calórica, corticoideterapia, agentes citostáticos, raios X ou pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pode resultar em doença pulmonar aguda e disfunção de órgãos, contribuindo para casos potencialmente fatais, provocados pela disseminação da larva para locais como cérebro, pulmões, fígado, vias

biliares, pâncreas, trato genito-urinário e pele, causando a estrogiloidíase disseminada (SCOWDEN, SCHAFFNER, STONE, 1978; MELTZER *et al.*, 1979; BRASITUS *et al.*, 1980; FERREIRA, 1991; TARANTO, 1995; KOTHARY, MUSKIE, MATHUR, 1999).

Considerando a gravidade desta parasitose em relação aos indivíduos imunologicamente deficientes, FERREIRA *et al.* (1999) descreveram 25 casos de estrogiloidíase e infecção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV) nos pacientes acompanhados no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, incluindo sete casos de síndrome de hiperinfecção, com confirmação necroscópica da disseminação a múltiplos órgãos, em dois destes.

Desde 1960 o tiabendazol e o albendazol têm sido as drogas utilizadas no tratamento da estrogiloidíase, mas apresentam vários efeitos colaterais e são pouco eficazes em programas de controles de endemia. Estudos demonstraram que a ivermectina tem sido a droga mais efetiva e segura no controle desta doença endêmica (LINDO *et al.*, 1996; CHIODINI *et al.*, 2000; ZAHA *et al.*, 2000).

### 1.5 Resposta imune na estrogiloidíase

O sistema imune caracteriza-se por apresentar pelo menos dois tipos distintos de células T *helper*, Th1 e Th2, que têm a propriedade de interagir negativamente entre si. O fenótipo Th2 está associado com respostas imunes contra alérgenos e helmintos. Nestes casos o mecanismo de resposta imune é T-dependente. As células T, predominantemente de fenótipo Th2, respondem ao antígeno do parasito e induzem a produção de IgE e IgG4 pelas células B, a proliferação dos mastócitos da mucosa, em resposta à IL-3 (Interleucina 3), IL-4 e IL-10 (ROITT, BROSTOFF, MALE 1999; ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2000; WATANABE *et al.*, 2000).

Indivíduos infectados com *S. stercoralis*, na Jamaica, apresentaram níveis de IgG1 inversamente correlacionados com a idade. O estudo sugeriu que a idade está correlacionada

com a infecção crônica por *S. stercoralis* em comunidades endêmicas, e indivíduos que adquirem a infecção precocemente podem permanecer infectados até a vida adulta. A elevada produção de IgG4 em combinação com a baixa resposta de IgE pode estabelecer a infecção e promover a estrogiloidíase crônica assintomática. A auto regulação nos níveis de IgA pode estar envolvida no controle de infecção crônica, em área não endêmica, pois interfere na redução da produção de IgG1 (ATKINS *et al.*, 1997).

Na estrogiloidíase ocorrem respostas não características como eosinofilia, resposta específica de IgE e IgG4 controladas por citocinas de células T (NEVA *et al.*, 1998; SATOH *et al.*, 1999).

O teste ELISA tem sido usado para investigar a presença de imunoglobulinas no soro (IgG1, IgG4, IgE e IgA) contra as larvas de *S. stercoralis*. Por este método pode-se observar a redução da resposta de anticorpos específicos no soro contra *S. stercoralis* em pacientes tratados corretamente com ivermectina, podendo ainda ser usado para calcular a eficácia deste quimioterápico no tratamento da estrogiloidíase endêmica (LINDO *et al.*, 1996).

## 1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da estrogiloidíase é confirmado pela presença das formas parasitárias de *S. stercoralis*. Os parasitos podem ser vistos nas fezes, no aspirado duodenal, urina ou ocasionalmente em outros fluidos corporais ou amostras de tecidos (ONUIGBO, IBEACHUM, 1991).

Para os pacientes com estrogiloidíase severa o exame da secreção do lavado brônquico ou a biópsia de pele tem sido o método diagnóstico mais provável, porém na maioria das vezes o diagnóstico é realizado *post mortem* (LEUNG, LIEW, SUNG, 1997).

Existem alguns relatos científicos onde a estrogiloidíase severa também foi diagnosticada por métodos alternativos, incluindo a biópsia de tecidos do sistema digestivo (NEWTON *et al.*, 1992), o exame do fluido alveolar (GENTA, MILES, FIELDS, 1989),



exame da secreção respiratória pelo microscópio fluorescente (NOMURA, REKRUT, 1996), endoscopia (SHARMA *et al.*, 2000), esfregaço do sangue periférico (ONUIGBO, IBEACHUM, 1991) e o fluido cerebrospinal (TAKAYANAGUI *et al.*, 1995).

O hemograma é um exame onde observam-se eosinófilos acima de 5% em 80% de indivíduos com estrogiloidíase. Pode haver presença ou ausência de eosinofilia em pacientes com estrogiloidíase severa, porém é um indicativo inespecífico da doença (ANDRADE NETO, ASSEF, 1996; LIU, WELLER, 1993; GORDON *et al.*, 1994).

O diagnóstico precoce da estrogiloidíase se torna fundamental, pois o tratamento nas fases iniciais pode prevenir as formas mais graves desta infecção bem como a disseminação em vigência da imunossupressão (MOURA *et al.*, 1989; SIDDIQUI *et al.*, 1997).

### 1.6.1 Diagnóstico parasitológico

Na grande maioria das pessoas, o parasito é encontrado em número muito reduzido além da liberação larval nas fezes ser mínima e irregular. Em uma infecção moderada, por exemplo, existe a probabilidade de existir não mais que 25 larvas L2/g de fezes, por isso o diagnóstico da estrogiloidíase é pouco sensível tornando a confirmação parasitológica da presença da infecção extremamente difícil (LIU, WELLER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000).

Para elevação da sensibilidade dos métodos parasitológicos, a colheita de até sete amostras fecais tem sido necessária, sugerindo uma flutuação da excreção larval durante a evolução da infecção, constituindo um problema comum no controle do tratamento desta doença e cura pós tratamento com quimioterápicos (DREYER *et al.*, 1996; PATIL *et al.*, 1999; UPARANUKRAW, PLONGSRI, MORAKOTE, 1999).

Vários estudos mostraram que a sensibilidade dos exames de fezes varia de 15 a 24%, elevando para 55 a 78% com a realização de três testes. Para aumentar a sensibilidade através do exame de fezes pode-se proceder a métodos de cultivo das formas larvárias do parasito utilizando meios de cultura especiais, que são trabalhosos e inviáveis na rotina laboratorial

(LINDO *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995).

As formas larvárias nas fezes podem ser visualizadas em esfregaço fecal direto com solução salina ou pelos métodos de concentração formol-éter (Ritchie), método de Baermann-Moraes, cultura em papel de filtro (Harada-Mori) e cultura em placa de ágar. Entre estes o que possui maior sensibilidade é o de Baermann-Moraes que, assim como o método de Rugai, baseia-se no hidro e termotropismo das larvas tendo como vantagem a simplicidade e rapidez de execução. A desvantagem é a mobilidade das larvas viáveis o que possibilita a contaminação acidental dos manipuladores, além da necessidade de fezes frescas, não utilizado como rotina laboratorial (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948; LIU, WELLER, 1993; GROVE, 1996; van der FELTZ *et al.* 1999; COSTA-CRUZ, 2000).

As técnicas de cultura dos helmintos são baseadas no desenvolvimento do seu ciclo indireto, onde um elevado número de larvas são produzidas, facilitando o diagnóstico. Assim, o método de Harada-Mori utiliza as fezes espalhadas em tira de papel de filtro, para cultivo num tubo contendo pequena quantidade de água; as larvas aparecem na água após um período de incubação de sete a dez dias, havendo variações desse método para placas de Petri com ágar líquido ou sólido (LIU, WELLER, 1993).

O método de placa de ágar para cultura de fezes modificado da cultura em ágar sólido, na qual a superfície do ágar é lavado com formalina para extração das larvas antes da centrifugação para o exame microscópico, é mais sensível se comparado às outras técnicas de cultivo (ARAKAKI *et al.*, 1990; KOGA *et al.*, 1991; De KAMINSKY, 1993; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995; SALAZAR, GUTIERREZ, BERK, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1996; ZAHA *et al.*, 2000)

### **1.6.2 Diagnóstico imunológico**

Detectar anticorpos específicos em amostras de soro, utilizando testes imunológicos como imunofluorescência indireta, ELISA e “Western Blotting” contribui para o diagnóstico

precoce da estrogiloidíase humana. Fato extremamente importante para os pacientes do grupo de risco, pois os exames de fezes apresentam baixa sensibilidade, além de variáveis envolvidas na execução das técnicas, sendo muitas vezes o diagnóstico realizado tardiamente quando o paciente já apresenta formas graves da doença (BAILEY, 1989; COSTA-CRUZ, 2000).

O diagnóstico sorológico pode ser útil no controle do tratamento de pacientes com infecções crônicas devido aos ciclos de auto-infecção persistentes, permitindo que o diagnóstico das formas extra-intestinais ocorra antes de manifestações sistêmicas, como pneumonite ou bacteremia (GROVE, BLAIR, 1981; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995).

O imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana tem sido direcionado preferencialmente para detecção de anticorpos da classe IgG contra antígenos larvais somáticos. Estes testes são mais sensíveis que o exame parasitológico, mas não são úteis para diferenciação entre a infecção crônica e a infecção aguda, além do fato de estarem correlacionados com a intensidade da resposta imune do indivíduo, sofrendo influência da idade entre outros fatores (BRASIL *et al.*, 1988; CONWAY *et al.*, 1993b; ROSSI *et al.*, 1993b; LINDO *et al.*, 1994; ATKINS *et al.*, 1997).

Diferentes testes imunológicos foram desenvolvidos tais como: teste cutâneo com extratos larvários (teste intradérmico) (PELLEGRINO, CHAIA, POMPEU MEMORIA, 1961), aglutinação indireta com partículas de gelatina (SATO *et al.*, 1991), métodos para pesquisa de IgE (BERZAK, 1975; GILL, BELL, FIFIELD, 1979; LEO, TOLEDO BARROS, MENDES, 1980; GENTA, DOUCE, WALZER, 1986; McRURY *et al.*, 1986; COSTA-CRUZ *et al.*, 2000), hemaglutinação indireta (GAM, NEVA, KROTOSKI, 1987), radioimunoabsorção (De MESSIAS *et al.*, 1987; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995), reação de imunofluorescência (Quadro 1), ELISA (Quadro 2), "Western blotting" (Quadro 3)

e antígenos recombinantes através de cDNA (SIDDIQUI, STANLEY, BERK, 2000; SIDDIQUI *et al.*, 2000).

Quadro 1 - Teste de imunofluorescência indireta no diagnóstico da estrongiloidíase humana

Antígeno	Técnica	Número de Amostras	Imunoglobulina	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Critério de positividade	Autor/Ano
<i>S. stercoralis</i>	cortes	43 Infectados	IgG	93,0	96,0	20	COUDERT <i>et al.</i> , 1968
	(músculo)	76 Controles					
<i>S. stercoralis</i>	tubos	45 Infectados	IgG	100,0	72,7	20	DAFFALA, 1972.
		44 Controles					
<i>S. ratti</i>	tubos	44 Infectados	IgG	98,0	89,0	4	GROVE, BLAIR, 1981
		116 Controles					
<i>S. stercoralis</i>	tubos	48 Infectados	IgG	92,0	94,2	20	GENTA, WEIL, 1982
		12 Infectados	IgM	1 + fraco	negativo	20	
		12 Infectados	IgA	negativo	negativo	20	
		52 Controles					
<i>S. cebus</i>	cortes	50 Infectados	IgG	82,0	96,0	80	CAMPOS <i>et al.</i> , 1988
	(músculo)	200 Controles					
<i>S. stercoralis</i>	cortes	54 Infectados	IgG	94,4	94,2	20	COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 1997
	(Tissue tek)	69 Controles		92,5	97,1	20	
<i>S. ratti</i>	(Tissue tek)	61 Infectados	IgG	93,4	96,9	20	COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 1999a
		125 Controles					

**Quadro 2 - Teste ELISA no diagnóstico da estrombolioífiase em amostras de soro humano.**

Extrato Antigenico	Número de Amostras	Imunoglobulina	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Critério de reatividade	Autor/Ano
Salino	45 Infectados	IgG	84,0	N.D.	N.D.	CARROL, KARTHIGASU, GROVE, 1981
<i>S. ratti</i>	45 Controles					NEVA, GAM, BURKE, 1981
Salino	51 Infectados	IgG	82,0	N.D.	8	
<i>S. stercoralis</i>	44 Controles		84,0	N.D.		GAM, NEVA, KROTOSKI, 1987
Salino	68 Infectados	IgG	83,8	90,2	8	
<i>S. stercoralis</i>	112 Controles		80,8	83,9		BRASIL <i>et al.</i> , 1988
<i>S. ratti</i>	27 Infectados	IgG	92,0	82,0	16	
Salino	17 Controles					GENTA, 1988
<i>S. stercoralis</i>	268 Infectados	IgG	88,0	99,0	8	
Salino	649 Controles					GENTA <i>et al.</i> , 1988
<i>S. stercoralis</i>	48 Infectados	IgG	83,3	N.D.	8	
Salino	20 Controles	IgA	89,5	N.D.		CONWAY <i>et al.</i> , 1993a
<i>S. stercoralis</i>	40 Infectados	IgG	100,0	58,0	200	
Salino	20 Controles					CONWAY <i>et al.</i> , 1993b
<i>S. stercoralis</i>	100 Infectados	IgG	91,0	70,4	200	
Salino	125 Controles					ROSSI <i>et al.</i> , 1993b
<i>S. stercoralis</i>	27 Infectados	IgG	85,2	N.D.	8	
Salino	12 Controles	IgA	77,8	N.D.		
<i>S. stercoralis</i>	20 Infectados	IgE	59,6	N.D.		LINDO <i>et al.</i> , 1994
Salino	125 Controles	IgG	80,0	94,0	200	
<i>S. stercoralis</i>	139 Controles					COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 1999a
Salino	61 Infectados	IgG	85,0	97,0	40	
Alcalino	125 Controles					
<i>S. ratti</i>	61 Infectados	IgA específica	42,6	95,4	20	
Salino	125 Controles		47,5	90,8		COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 1999b
Alcalino						
<i>S. ratti</i>	40 Infectados	IgE específica	62,5	98,7	IE=100	
Salino	40 Controles					COSTA-CRUZ <i>et al.</i> , 2000
<i>S. ratti</i>						

N.D. = Não Descrito IE=Índice ELISA

Quadro 3 – Teste de “Western Blotting” utilizando amostras de soro humano no diagnóstico da estrombolioíase humana

Antígeno Salino	Número da Amostras	Imunoglobulina	Frações protéicas imunodominantes (kDa)	Autor/Ano
<i>S. stercoralis</i>	“Pool” de regiões diferentes	IgG	17, 20, 23, 25, 30, 40, 55, 90 e 100	GENTA <i>et al.</i> , 1988
<i>S. stercoralis</i>	41 Infectados 15 Controles	IgG4 e subclasses	46, 72 e 78	GENTA, LILLIBRIDGE, 1989
<i>S. stercoralis</i>	56 Infectados 9 Controles	IgG	26, 41, 66 e 97	SATO <i>et al.</i> , 1990
<i>S. stercoralis</i>	100 Infectados 125 Controles	IgG	28, 31 e 41	CONWAY <i>et al.</i> , 1993b
<i>S. stercoralis</i>	20 Infectados 139 Controles	IgG	28, 31 e 41	LINDO <i>et al.</i> , 1994
<i>S. stercoralis</i>	20 Infectados	IgG1 IgG4 IgG	28, 31 e 41	CONWAY <i>et al.</i> , 1994
<i>S. stercoralis</i>	56 Infectados 51 Controles	IgG	28, 31, 41 e 205	UPARANUKRAW, PHONGSRI, MORAKOTE 1999
<i>S. stercoralis</i>	17 Infectados 17 Controles	IgG1 IgG4 IgE IgA	19, 21, 29, 30, 31, 33, 40 e 44 19, 21, 29, 30, 31, 33, 40 e 44 29, 30, 31, 32, 33 e 44 19, 21, 26, 29, 33, 40 e 48	ATKINS <i>et al.</i> , 1999

## 1.7 Antígeno Heterólogo

*Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) é um parasito endêmico de rato e camundongos. O ciclo de vida apresenta gerações de vida livre e fêmea parasitária. A geração parasitária consiste unicamente de fêmeas parasitas adultas as quais situam-se embebidas na mucosa do intestino delgado de ratos. Os ovos produzidos por estas fêmeas são eliminados com as fezes para o meio ambiente (VINEY, 1999).

Podem ocorrer duas formas de desenvolvimento, o ciclo direto e o indireto. No desenvolvimento do ciclo direto, larvas L1 sofrem muda para o estágio L2 e L3. Esta última é a larva infectante que penetra na pele dos hospedeiros. No ciclo indireto, as larvas sofrem muda para estágio L4, finalmente maturando como machos e fêmeas de vida livre (VINEY, 1999).

As larvas do estágio inicial de *S. ratti* têm um desenvolvimento seletivo. Apesar de ser um parasito obrigatório, uma parte significativa do ciclo ocorre fora do hospedeiro. Isto tem a vantagem prática de que o estágio de vida livre pode ser facilmente desenvolvido e manipulado em fezes de animais infectados (VINEY, 1999; PATERSON, FISHER, VINEY, 2000; von SAMSON *et al.*, 2000).

Estudos citológicos de *S. ratti* sugerem que os parasitos adultos reproduzam por partenogênese mitótica, ou seja a seqüência genética de uma progênie da fêmea parasita é geneticamente idêntica entre si e à de sua mãe (NIGON, ROMAN, 1952; VINEY, 1994). Os estádios de vida livre são dióicos com reprodução pseudogâmica, na qual o esperma estimula os ovos a desenvolverem, mas não têm contribuição genética, portanto a herança é somente materna (BOLLA, ROBERTS, 1968).

A composição antigênica de *Strongyloides* de roedores (*S. ratti* e *S. venezuelensis* Brumpt, 1934) foi comparada com a de *S. stercoralis* e observou-se que estas espécies podem ser utilizadas como antígenos heterólogos para o diagnóstico sorológico, em substituição ao



antígeno de *S. stercoralis*, provendo uma fonte constante e segura de antígeno em laboratório (GROVE, BLAIR, 1981; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

A dificuldade de obtenção de larvas de *S. stercoralis* tem sido um fator limitante para o desenvolvimento de reações mais sensíveis e específicas que possam ser empregadas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase. Diante disto, é conveniente a utilização de antígenos provenientes de *S. ratti*, um helminto de ratos silvestres que infecta facilmente o rato branco e pode ser mantido em laboratório, produzindo um grande número de larvas filarióides a partir de culturas de fezes de ratos experimentalmente infectados, o que simplifica a obtenção de extratos antigênicos (PELLEGRINO, CHAIA, POMPEU MEMORIA, 1961; ROSSI *et al.*, 1993a).

Na Universidade Federal de Uberlândia, COSTA-CRUZ *et al.* (1997) padronizaram o teste de imunofluorescência indireta (IgG) como teste diagnóstico da estrogiloidíase humana, empregando antígenos de *S. stercoralis* e *S. ratti*, recomendando o segundo (antígeno heterólogo) pela facilidade de obtenção em laboratório, já que não existiu diferença estatisticamente significativa entre a sensibilidade e especificidade obtidas e houve correlação linear entre os títulos de anticorpos, quando foram comparados os antígenos homólogos e heterólogos.

Posteriormente, COSTA-CRUZ *et al.* (1999) padronizaram o teste ELISA, utilizando extrato salino e alcalino de *S. ratti*, para a detecção de IgG como diagnóstico para a estrogiloidíase humana.

Considerando que o diagnóstico precoce da estrogiloidíase humana trará benefícios para os indivíduos assintomáticos e os imunossuprimidos, torna-se relevante o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos e sensíveis (De PAULA *et al.*, 2000).

## 2. OBJETIVOS

Realizar o teste "Western blotting" empregando-se extrato salino de *S. ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana, comparando-o com os testes de Imunofluorescência Indireta e ELISA na detecção de IgG em amostras de soro humano.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 3.2 Obtenção de *Strongyloides ratti*

Para a obtenção de *S. ratti* foram cultivadas fezes de ratos fêmeas e machos da espécie *Rattus rattus* pesando entre 100 a 150g, padrão sanitário convencional, mantidos experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-Universidade Federal Goiás e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia da UFU.

Os animais, foram inoculados com aproximadamente 2000 larvas de *S. ratti* por via subcutânea e após dez dias colocados em gaiolas metálicas, forradas com papel umedecido em água, permanecendo por uma noite para defecação. Posteriormente, foi feita a colheita das fezes para proceder o cultivo pelo método de Looss (item 3.2.1). No 6º dia, foram obtidas larvas pelo método de Baermann-Moraes (item 3.2.2). A contagem de larvas foi realizada em três lâminas contendo, cada uma, 5µL da suspensão de parasitos medidos por pipeta automática. A quantidade de larvas existentes em 1 mL foi verificada através da média das três lâminas.

Parte das larvas obtidas foram utilizadas para manutenção do ciclo evolutivo de *S. ratti* em *R. rattus* e a outra parte foi mantida a -20°C para preparo do extrato antigênico.

##### 3.2.1 Método de Looss

A coprocultura foi realizada utilizando o método de Looss (IN: NEVES *et al.*, 1998) misturando-se partes iguais de material fecal e carvão vegetal triturados em grãos pequenos ligeiramente umedecidos e posteriormente colocados em placas de Petri, de modo a formar

uma camada não espessa, que permaneceu em repouso em estufa incubadora B.O.D. (Fanem, São Paulo) a 25°C por cinco dias. Após este procedimento as larvas filarióides de *S. ratti* foram recolhidas pelo método de Baermann-Moraes.

### **3.2.2 Método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948)**

Em um suporte de madeira foram colocados funis de vidro com diâmetro de 11,5 cm, cuja haste continua em tubo de borracha de 10 cm, nos quais foram acoplados tubos de ensaio de vidro de 10 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, obliterando-se a passagem de água.

Cada funil foi preenchido até a borda com água de torneira aquecida à 45° C. Sobre o mesmo foi colocado uma tela metálica (100 malhas por cm<sup>2</sup>) e gaze dobrada em quatro, depositando-se aproximadamente 3g de fezes. A gaze com a amostra fecal sem conservante foi deixada em contato com a água, em repouso por uma hora. Após este período, o tubo de ensaio foi retirado com cerca de 5 a 7 mL de solução contendo água e possíveis larvas.

Após concentração por centrifugação a 1000xg por 5 minutos o material foi analisado em microscópio óptico de luz (OLYMPUS, Japão) em aumentos de 100x e 400x. Para retirar os resíduos de carvão, as larvas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 durante três minutos por cinco vezes e conservadas à -20°C até o momento do uso.

## **3.3 Produção de antígenos de *S. ratti***

### **3.3.1 Para o teste de Imunofluorescência Indireta**

As larvas filarióides, obtidas conforme o item 3.2, foram incluídas em resina "Tissue Tek®" (MILES, USA) e submetidas a cortes de quatro micra de espessura em criostato (CRYOCUT, Leica) a -30°C, conforme COSTA-CRUZ *et al.* (1997). Os cortes foram depositados às lâminas de microscopia, previamente desengorduradas pela passagem de álcool-éter PA (v/v) a temperatura ambiente e conservados a -20°C até o momento do uso. Foram utilizadas as lâminas que continham no mínimo cinco cortes de larvas visualizadas ao aumento de 200X.

### 3.3.2 Para ELISA e “Western blotting” (extrato salino)

As 288.000 larvas de *S. ratti* obtidas foram descongeladas, ressuspensas em 1 mL de solução PBS a 0,15 M, pH 7,2 contendo inibidores de proteases (1mM EGTA, 10mM EDTA, 0,05mM PMSF) colocadas no homogeneizador de tecidos (Nova técnica, São Paulo) cinco vezes por um minuto e posteriormente rompidas, para extração protéica, através de ultra som (Thornton, São Paulo) em oito períodos de 20 segundos em banho de gelo. O material foi deixado sob agitação lenta por 18 horas à 4°C. Após este período foi centrifugado a 3000xg por 30 minutos à 4°C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de LOWRY (LOWRY *et al.*, 1951). O extrato obtido foi utilizado para a realização dos testes ELISA e “Western blotting”.

### 3.4 Obtenção das amostras de soro

Os pacientes com estrogiloidíase e os com outras parasitoses foram triados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU pelo método de Blagg ou MIFC “Mertiolate, Iodo, Formol, Conservante” (IN: NEVES *et al.*, 1998) e no Laboratório de Parasitologia da UFU pelos métodos de Baermann-Moraes e de Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934). O grupo de indivíduos sadios foi constituído de estudantes universitários, que não apresentaram larvas de *S. stercoralis* ou outra parasitose em três exames de fezes realizados pelos métodos de Baermann-Moraes e de Hoffmann, Pons e Janer e que não possuíam história anterior de estrogiloidíase. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação a 1000xg por cinco minutos e armazenadas em alíquotas à -20°C até o momento do uso.

#### 3.4.1 Amostras de soro padrão positivo e negativo

A amostra de soro padrão positivo foi constituída de um paciente com estrogiloidíase que apresentou larvas rabsitóides nas fezes pelo método de MIFC. As três amostras de soro

padrão negativo de indivíduos sadios, foram negativos em três exames de fezes pelo método de Baermann-Moraes e de Hoffmann, Pons e Janer para *S. stercoralis* e outros parasitos não apresentando história anterior de strongiloidíase.

### 3.5 Produção do soro imune

O soro imune, já disponível no Laboratório de Parasitologia da UFU, foi obtido de um coelho macho da espécie *Oryctolagus cuniculus* pesando 2,4Kg. Antes da inoculação o animal passou por um período de adaptação, de aproximadamente 1 mês, no Laboratório de Parasitologia da UFU, sendo submetido a exames de fezes pelo método de Baermann-Moraes e Hoffmann, Pons e Janer para descartar a possibilidade de uma infecção prévia. Após este período foi colhida uma amostra de soro normal, com intuito de ser utilizado como soro padrão negativo. Posteriormente, o animal recebeu 500µg de extrato salino de *S. ratti* por mL realizado da mesma maneira que no item 3.3.2 em cada inoculação, sendo observado o intervalo de duas semanas entre as nove inoculações sucessivas. A amostra de sangue do coelho foi colhida por punção auricular, antes da inoculação e com intervalo de duas semanas no último mês das inoculações para avaliação dos anticorpos presentes. Após 4 meses de acompanhamento, o animal foi submetido a punção cardíaca com sangria total e a amostra de soro foi armazenada à - 20°C até o momento de uso.

### 3.6 Obtenção de gamaglobulina imune

Foi obtida gamaglobulina do coelho imunizado por precipitação salina. Para tanto, a 5mL do antisoro, adicionou-se gota a gota 5mL de solução de sulfato de amônio 3,12M pH 6,5 em banho de gelo. Após 18 horas a 4°C a solução foi centrifugada a 300xg por 30 minutos à 4°C e o sedimento lavado três vezes em solução de sulfato de amônio 1,56M pH 6,5.

O sedimento foi dissolvido na metade do volume original e dialisado por 24 horas a

4°C contra solução salina com freqüentes trocas de banho; após centrifugação a 3000xg do material o sobrenadante foi armazenado à -20°C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de LOWRY (LOWRY *et al.*, 1951).

### 3.7 Teste de Imunofluorescência Indireta (I.F.I.)

O teste de imunofluorescência indireta para detecção de IgG foi realizado de acordo com COSTA-CRUZ *et al.*, (1997) considerando positivas as amostras de soro testes que apresentaram título  $\geq 20$ . Às lâminas contendo os cortes de *S. ratti* foram adicionadas amostras de soro controle positivo e negativo e as amostras de soro testes na diluição de triagem de 1:20 em PBS 0,01M, pH 7,2, em câmara úmida. Após 30 minutos à 37°C as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos (três vezes) e foi adicionado conjugado anti IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA, USA) no título ideal de 100 diluídos em PBS mais azul de Evans (Interlab, São Paulo) a 1%. Após 30 minutos a 37°C as lâminas foram novamente lavadas em PBS por cinco minutos três vezes, secadas e montadas em glicerina alcalina (Merck, Germany) pH 8,5. As reações foram avaliadas em microscópio de imunofluorescência (OLYMPUS BH-2-RFC, Japão) em aumentos de 200x e 400x equipado com lâmpada de mercúrio, filtro de interferência e filtro de barreira. As amostras de soros positivos foram tituladas na razão dois.

### 3.8 Teste ELISA

O teste ELISA para detecção de IgG foi realizado de acordo com COSTA-CRUZ *et al.* (1999) considerando positiva as amostras de soro testes que apresentaram título  $\geq 40$ . Empregaram-se placas de poliestireno (DIFCO, Interlab, São Paulo) como suporte para adsorção de 50µl do extrato salino de *S. ratti* na concentração ideal de 10 µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. As placas, mantidas em câmara úmida, foram

sensibilizadas à 4°C durante 18 horas. Após este período e três lavagens de cinco minutos com PBS contendo Tween 20 (SIGMA, USA) (PBS-T) a 0,05% foram adicionadas 50 µl de uma amostras de soro padrão positivo, três padrões negativos e amostras de soro testes na diluição 1:40. Após incubação por 45 minutos à 37°C e 3 lavagens de cinco minutos com PBS - T a 0,05% foram adicionados 50 µl de conjugado anti IgG humana marcada com peroxidase (cadeia Fc específica, SIGMA, USA), no título ideal de 1000, por um período de 45 minutos à 37°C. Após três lavagens, a reação foi revelada pela adição de 50 µl do substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) e solução cromógena de ortofenileno diamina (OPD, Merck, Germany), preparado no momento do uso (10µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + 10mg de OPD + 25ml de tampão citrato fosfato pH 5,0). Após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µl de solução 2 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Germany) e os valores da absorvância foram determinados a 490 nm em leitor de ELISA (Metrolab-980, Argentina).

O limiar da reatividade (*cut off*) foi determinado pela média aritmética das densidades ópticas das amostras de soros padrão negativo acrescidos de dois desvios padrões para cada reação (BASSI *et al.*, 1991).

### 3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS a 12% (SDS-PAGE) para realização do Teste de "Western Blotting"

O extrato salino de *S. rattii* foi submetido à eletroforese vertical (Sistema Biorard, USA), utilizando um gel de poliacrilamida desnaturante a 12% contendo sulfato duodecil de sódio a 0,1% (SDS-PAGE), de acordo com a técnica descrita por LAEMMLI (1970).

As proteínas nas amostras foram comparadas aos padrões de peso molecular Rainbow<sup>TM</sup> (AMERSHAM, England) das proteínas: miosina (220 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (46 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e Lisozima (14,3 kDa).



Para preparação do gel de separação, foram utilizados: Tris-HCl 0,375M, pH 8,8 (Sigma); SDS 0,1% (Sigma); ácido-etileno-diamino-tetra-acético 2mM (EDTA) (MERCK, GERMANY); solução acrilamida 30% / bis-acrilamida (n,n'-metileno-bis-acrilamida) 0,8% (SIGMA); água bidestilada; n,n,n,n-tetrametil-aminometano 0,125% (TEMED) (SIGMA) e persulfato de amônio 0,125% (APS) (Sigma).

A solução correspondente ao gel de separação foi adicionada lentamente entre placas de vidro (10cm x 8cm), adequadamente seladas com solução em vaselina neutra e espaçadores de teflon. Para evitar a polimerização em presença de oxigênio, foi adicionada uma camada de butanol (MERCK), que foi descartada logo após a polimerização completa do gel. Em seguida, preparou-se o gel de empilhamento a 5%. Para esta solução foram utilizados: TRIS-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%, EDTA 2mM; solução acrilamida 29% / bis-acrilamida 1% (n,n'-metileno-bis-acrilamida); água bidestilada; TEMED 0,125% e APS 0,125%. O gel de empilhamento foi adicionado sobre o gel de separação e moldado por teflon para a formação de espaços para a aplicação das amostras.

Após a polimerização completa do gel foi aplicada a amostra antigênica, a qual foi previamente fervida por 2 minutos, em concentração aproximada de 5 µg de proteínas por tira. No momento de uso, o material antigênico foi diluído na proporção de 1:1 em tampão de amostra (TRIS-HCl 0,1 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2% e água bidestilada). Foram aplicados também, padrões de alto e baixo peso molecular (SIGMA, USA).

As placas de vidro foram encaixadas na cuba para eletroforese contendo tampão TRIS-glicina 0,025M pH 8,3 e a corrida do gel foi realizada em corrente constante de 25 mA (Sistema Biorard, USA) por aproximadamente uma hora.

### 3.10 Titulação do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana peroxidase pelo teste ELISA para a aplicação no teste “Western Blotting”

O conjugado de cabra anti-IgG humana peroxidase (cadeia total, SIGMA, USA), foi testado, utilizando os mesmos reagentes e procedimentos descritos para o teste ELISA. Realizou-se à seguir a titulação do conjugado obtido frente a duas amostras de soro positivas para estrogiloidíase e duas negativas para esta parasitose e, controles somente de diluente para o antígeno utilizando-se o teste ELISA. O conjugado foi testado nas diluições: 1/500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000 em PBS-T 0,05%. As amostras de soro foram diluídas 1:40 em PBS-T 0,05% e o extrato salino de *S. ratti* foi utilizado na concentração de 10 µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). O título ideal foi escolhido após análise comparativa das densidades ópticas das amostras, sendo que para o teste “Western blotting” adotou-se um título dez vezes menor do que o apresentado pelo teste ELISA.

### 3.11 Teste de “Western blotting”

O teste de “Western-blotting” foi utilizado para identificar o perfil de peptídeos do extrato salino de *S. ratti*, reconhecido pela gamaglobulina obtida no item 3.6 e amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, com outras parasitoses e indivíduos sadios (item 3.4), isoladamente. Assim, amostra do extrato salino contendo aproximadamente 3µg/cm<sup>2</sup>, preparado conforme o item 3.3.2 foi submetida à SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), juntamente com padrões de alto e baixo peso molecular.

Após a migração eletroforética das proteínas foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose (Sigma, USA) com porosidade de 0,45µm, de acordo com a técnica descrita por TOWBIN, STAEBELIN, GORDON (1979). Para a transferência a membrana foi preparada como se segue: duas folhas de papel de filtro (Munktell, Grau 1F, Pharmacia LKB), a membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida contendo as frações

antigênicas e mais duas folhas de papel de filtro; todas umedecidas em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%) e colocadas em uma cuba de transferência para aplicação sob corrente elétrica de  $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$  durante duas horas (Sistema Hoefler, USA).

Terminada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corado em solução de Ponceau-S 0,5% (SIGMA, USA) em ácido acético 1%, para visualizar as frações antigênicas verificando-se a eficiência da transferência. A membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras verticais de 3mm de largura, lavadas com água destilada e bloqueando os sítios ativos com 1ml de solução PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (MOLICO, Nestlé) (PBS-TM) por duas horas, à temperatura ambiente, sob agitação horizontal lenta, em câmara úmida. Após este período foi desprezada a solução bloqueadora e adicionadas às tiras 200 $\mu\text{l}$  das amostras de soro diluídas a 1:40 e incubadas por 18 horas à 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente, as tiras foram submetidas a seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-TM a 1%. O conjugado de cabra anti-IgG humana peroxidase (cadeia total, Sigma, USA) foi diluído em PBS-TM a 1% no título ideal de 200 e adicionado às tiras, incubando-as por duas horas em temperatura ambiente. A revelação da reatividade foi efetuada pela adição de 200 $\mu\text{l}$  da solução de 5ml de água destilada para cada pastilha de 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma-USA) e outra pastilha de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% com tampão ureia. Após um período de aproximadamente 5 minutos as frações antigênicas (kDa) foram visualizadas com uma coloração marrom, e a reação foi interrompida por lavagens sucessivas em água destilada. As tiras foram secas em temperatura ambiente foram estocadas até posterior análise.

### 3.11.1 Coloração do gel

A coloração do gel foi feita por Comassie Brilliant Blue R250 para visualizar se foram transferidas as proteínas para a membrana de nitrocelulose, na qual os polipeptídeos se destacariam em tons azuis. O gel descrito no item 3.9 foi cuidadosamente mergulhado em

solução fixadora contendo metanol 50%, ácido acético 10% e água bidestilada por 30 minutos. Após esse tempo, removeu-se o fixador e corou-se com a solução de Comassie Brilliant Blue R250 a 0,1% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se o corante e acrescentou-se a solução descorante (etanol 30%, ácido acético e água deionizada) trocando-a até não aparecer mais a cor azul no descorante.

### 3.12 Análise estatística

Para o cálculo de sensibilidade e especificidade, avaliando-se as diferenças entre duas ou mais proporções foram utilizados os testes Qui-quadrado corrigido (teste de Yates) e teste de McNemar admitindo-se erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ) do "software" "Statistic for Windows-Release 4.5 A" (State soft, Inc. 1993).

Os pesos moleculares aparentes das frações protéicas foram identificados por anticorpos nas amostras de soro testes a partir da curva de regressão linear contruída pelos valores dos pesos moleculares multiplicado pela motilidade relativa (Rf), obtida através da fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distância da origem de migração}}{\text{Distância da origem do ponto de referência}}$$

Os resultados do teste de "Western blotting" foram interpretados pelo programa de computação Excel 4.0, por meio do teste de regressão linear, utilizando a equação da reta, e os cálculos das significâncias entre diferentes frequências incluíram um erro máximo de 5% ( $p \leq 0,05$ ). A hipótese nula foi aceita quando  $p \geq 0,05$  (5%).

### 3.13 Normas de biossegurança

Todo o procedimento de colheita, manuseio do material biológico e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de segurança compatíveis (CHAVES-BORGES, MINEO, 1997).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Obtenção de *Strongyloides ratti*

Foram obtidas 310.000 larvas filarióides de *S. ratti*, após a cultura de fezes de *R. rattus*, infectados experimentalmente.

### 4.2 Produção de antígenos

#### 4.2.1 Para Imunofluorescência Indireta

Foram produzidas 40 lâminas contendo 10 cortes de larvas filarióides de *S. ratti* em cada lâmina.

#### 4.2.2 Para testes ELISA e "Western blotting"

Foram utilizadas 288.000 larvas filarióides para obtenção do extrato salino de *S. ratti*. A concentração protéica foi de 1300 µg/ mL, o volume obtido de 4 ml e o rendimento protéico de 18,06 ng/larva.

### 4.3 Identificação das amostras de soros testadas

A Tabela 1 mostra a distribuição por sexo dos pacientes com estrogiloidíase, pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios. Foram estudados 180 amostras de soro de indivíduos, das quais 85 (47,3%) pertenciam a indivíduo de sexo masculino e 95 (52,7%) ao sexo feminino. No grupo dos indivíduos com estrogiloidíase (n=80) a idade variou de 4 a 80 anos (36,9±16,5) e nos grupos controles (indivíduos sadios e com outras parasitoses) a idade variou de 1 a 70 anos (21,6±12,8).

Tabela 1 – Distribuição por sexo dos 80 pacientes com estrogiloidíase, 60 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios.

Sexo	Nº de Indivíduos n (%)	Grupo de Indivíduos		
		Estrongiloidíase n (%)	Outras parasitoses n (%)	Sadios n (%)
Masculino	85(47,3%)	49 (61,3%)	25 (41,7%)	11 (27,5%)
Feminino	95 (52,7%)	31 (38,7%)	35 (58,3%)	29 (72,5%)
Total	180 (100%)	80 (100%)	60 (100%)	40 (100%)

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam, respectivamente, dados dos 80 pacientes com estrogiloidíase, 60 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios, quanto ao sexo, idade e resultados dos níveis de IgG séricas detectadas nos testes de I.F.I., ELISA e “Western blotting”.

Os 60 pacientes com outras parasitoses estavam todos monoparasitados e apresentaram a seguinte freqüência de parasitos: *Ancilostomídeos* 33,3% (n=20); *Ascaris lumbricoides* 11,7% (n=7); *Enterobius vermicularis* 11,7% (n=7); *Hymenolepis nana* 15% (n=9); *Trichuris trichuria* 10% (n=6); *Schistosoma mansoni* 10% (n=6) e *Giardia lamblia* 8,3% (n=5) (Tabela 3).

A Tabela 5 mostra a distribuição dos títulos de IgG detectados pela I.F.I. e teste ELISA, respectivamente, em 80 amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase e 100 amostras de soro controle. A sensibilidade do I.F.I. foi 90,0% e a especificidade 100% e a do teste ELISA 100% e 98%, respectivamente.

Tabela 2 - Identificação dos 80 casos de estrogiloidíase segundo sexo, idade e resultados laboratoriais utilizando antígeno de *S. ratti* para os testes I.F.I., ELISA e "Western blotting" na detecção de IgG em amostras de soro humano. Critério de Positividade títulos \* $\geq 20$  e \*\* $\geq 40$

Caso	Sigla	Sexo	Idade (anos)	IFI - IgG*	ELISA - IgG**	"Western Blotting"
1	JLS	M	39	40	40	+
2	JFC	M	29	80	40	+
3	JSB	M	54	160	160	+
4	JFC	M	54	40	80	+
5	EE	M	54	40	80	+
6	CAR	M	50	80	40	+
7	AVP	M	63	40	80	+
8	SMS	F	20	20	40	+
9	MCOS	F	30	40	40	+
10	NLC	F	20	80	40	+
11	EM	M	21	40	80	+
12	AAS	M	32	20	40	+
13	E	M	57	20	80	+
14	JP	M	41	160	80	+
15	IDF	M	57	40	80	+
16	VLS	M	24	160	160	+
17	JFC	M	47	40	160	+
18	HLS	M	34	160	80	+
19	ABB	M	41	80	80	+
20	LAN	M	26	80	80	+
21	GFS	M	60	160	80	+
22	AMM	M	18	160	160	+
23	VOO	M	33	80	160	+
24	MFS	M	55	80	160	+
25	JAS	M	41	160	80	+
26	CR	M	20	320	160	+
27	JAS	M	73	640	40	+
28	SP	F	19	1280	320	+
29	LEM	F	47	160	160	+
30	EVCA	F	31	80	80	+
31	NPS	M	14	40	80	+
32	MCFC	F	25	20	80	+
33	RGB	M	33	640	160	+
34	ESS	M	37	80	160	+
35	LPRO	F	61	160	320	+
36	GGR	M	24	80	80	+
37	RAM	M	57	160	80	+
38	DFS	F	41	40	80	+
39	MALM	F	25	80	80	+
40	DAT	F	09	160	320	+
41	DV	F	69	160	80	+
42	JMR	M	67	20	40	+
43	MEE	F	46	negativo	40	+
44	GLC	M	48	20	40	+
45	JS	M	36	20	80	+
46	JJ	M	38	negativo	40	+
47	AS	M	42	80	40	+
48	GMO	M	58	80	80	+
49	JBS	M	46	80	40	+
50	MJS	F	31	20	40	+
51	KCS	F	19	160	80	+
52	IPB	F	39	20	40	+
53	DXM	M	23	160	80	+
54	MD	M	22	160	160	+
55	WL	M	52	80	40	+
56	MAS	F	31	40	40	+
57	SMA	M	40	20	80	+
58	LLN	M	41	40	160	+
59	RP	M	60	20	40	+
60	VPB	M	42	40	320	+
61	CCP	F	18	80	80	+
62	GMM	F	58	80	80	+
63	JS	F	24	160	160	+
64	SAM	F	80	320	320	+
65	MSC	F	26	1280	320	+
66	LSM	F	17	2560	80	+
67	CH	F	29	320	160	+
68	DGF	F	39	160	160	+
69	ME	F	18	negativo	80	+
70	LCV	F	5	negativo	80	+
71	BPB	F	4	negativo	40	+
72	EPC	M	46	20	80	+
73	E	M	16	80	80	+
74	C	F	18	160	160	+
75	AM	F	24	20	40	+
76	JSS	M	32	20	80	+
77	JOBS	M	35	20	80	+
78	EEB	F	27	negativo	40	+
79	NC	M	40	negativo	80	+
80	DM	M	30	negativo	80	negativo

Tabela 3 - Identificação dos 60 casos de pacientes com outras parasitoses segundo sexo, idade e resultados laboratoriais utilizando antígeno de *S. ratti* para os testes I.F.I., ELISA e "Western blotting" na detecção de IgG em amostras de soro humano. Critério de Positividade títulos  $\geq 20$  e  $\geq 40$

Caso	Sigla	Sexo	Idade (anos)	Outras Parasitoses	IFI - IgG*	ELISA - IgG**	"Western Blotting"
1	MMFS	F	24	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
2	CCS	F	22	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
3	LRO	F	24	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
4	MAS	F	58	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
5	RPS	M	56	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
6	ESTL	F	23	Ancilostomídeo	negativo	negativo	+
7	MAS	F	37	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
8	ALC	M	70	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
9	RSP	F	14	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
10	SIC	F	25	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
11	ERS	F	20	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
12	APM	M	26	Ancilostomídeo	negativo	40	+
13	JRS	M	41	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
14	OAA	F	45	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
15	SWHR	M	34	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
16	DCR	F	21	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
17	CARS	F	18	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
18	BBD	M	40	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
19	WS	M	25	Ancilostomídeo	negativo	negativo	+
20	JSS	M	47	Ancilostomídeo	negativo	negativo	negativo
21	ABS	M	4	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
22	RFP	M	4	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
23	ASN	M	5	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
24	SSS	M	9	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
25	JDSB	F	18	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
26	ESMF	F	32	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
27	SSS	M	9	<i>Ascaris lumbricoides</i>	negativo	negativo	negativo
28	MDGS	M	10	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	negativo
29	LCM	F	2	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	negativo
30	VAO	M	5	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	negativo
31	NKA	F	5	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	+
32	SMLS	F	23	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	negativo
33	RSD	M	9	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	negativo
34	COJ	M	6	<i>Enterobius vermicularis</i>	negativo	negativo	negativo
35	MF	F	17	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
36	LGP	F	18	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
37	MCNS	F	22	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
38	PAN	M	40	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
39	AES	M	45	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
40	SMLS	F	21	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
41	MCNS	F	22	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
42	RNC	F	24	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
43	EGS	M	14	<i>Hymenolepis nana</i>	negativo	negativo	negativo
44	MRA	F	22	<i>Trichuris trichiura</i>	negativo	negativo	negativo
45	JRL	M	2	<i>Trichuris trichiura</i>	negativo	negativo	negativo
46	AFRB	F	25	<i>Trichuris trichiura</i>	negativo	negativo	negativo
47	CM	F	23	<i>Trichuris trichiura</i>	negativo	negativo	negativo
48	RMM	F	25	<i>Trichuris trichiura</i>	negativo	negativo	negativo
49	IRFS	F	4	<i>Trichuris trichiura</i>	negativo	40	+
50	RA	F	23	<i>Schistosoma mansoni</i>	negativo	negativo	negativo
51	RMR	M	20	<i>Schistosoma mansoni</i>	negativo	negativo	negativo
52	MBO	F	24	<i>Schistosoma mansoni</i>	negativo	negativo	negativo
53	MSR	F	33	<i>Schistosoma mansoni</i>	negativo	negativo	negativo
54	CMV	F	38	<i>Schistosoma mansoni</i>	negativo	negativo	negativo
55	RAF	F	21	<i>Schistosoma mansoni</i>	negativo	negativo	negativo
56	ASA	F	11	<i>Giardia lamblia</i>	negativo	negativo	negativo
57	JSSP	M	3	<i>Giardia lamblia</i>	negativo	negativo	negativo
58	ALR	M	2	<i>Giardia lamblia</i>	negativo	negativo	negativo
59	MFM	F	3	<i>Giardia lamblia</i>	negativo	negativo	negativo
60	AHM	M	2	<i>Giardia lamblia</i>	negativo	negativo	negativo

(+) positivo



Tabela 4 - Identificação dos 40 casos de indivíduos sadios segundo sexo, idade e resultados laboratoriais utilizando antígeno de *S. rattii* para os testes I.F.I., ELISA e "Western blotting" na detecção de IgG em amostras de soro humano. Critério de Positividade títulos \* $\geq 20$ /\*\* $\geq 40$ .

Caso	Sigla	Sexo	Idade (anos)	IFI - IgG*	ELISA - IgG*	"Western Blotting"
1	KCS	F	9	negativo	negativo	negativo
2	LCFF	F	3	negativo	negativo	negativo
3	DSR	M	11	negativo	negativo	+
4	GDCN	M	10	negativo	negativo	+
5	KOS	F	2	negativo	negativo	negativo
6	JAO	F	1	negativo	negativo	negativo
7	EL	F	24	negativo	negativo	negativo
8	RSC	F	21	negativo	negativo	negativo
9	IMA	F	25	negativo	negativo	negativo
10	RDS	M	21	negativo	negativo	negativo
11	BVS	F	23	negativo	negativo	negativo
12	ACM	F	21	negativo	negativo	negativo
13	LPS	F	21	negativo	negativo	negativo
14	AM	M	25	negativo	negativo	negativo
15	JJ	F	21	negativo	negativo	negativo
16	CVF	F	22	negativo	negativo	negativo
17	NF	F	22	negativo	negativo	negativo
18	LMO	F	28	negativo	negativo	negativo
19	TAL	F	21	negativo	negativo	negativo
20	AVS	F	23	negativo	negativo	negativo
21	JAMM	M	21	negativo	negativo	negativo
22	PFS	F	19	negativo	negativo	negativo
23	MFTS	M	22	negativo	negativo	negativo
24	HS	F	22	negativo	negativo	negativo
25	FCF	M	24	negativo	negativo	negativo
26	LBS	F	23	negativo	negativo	negativo
27	LBE	F	23	negativo	negativo	negativo
28	TMP	M	23	negativo	negativo	negativo
29	PSVC	M	23	negativo	negativo	negativo
30	RTSM	F	41	negativo	negativo	negativo
31	FGF	F	21	negativo	negativo	negativo
32	MJ	F	23	negativo	negativo	negativo
33	GBF	M	23	negativo	negativo	negativo
34	TAL	F	21	negativo	negativo	negativo
35	AFA	F	23	negativo	negativo	negativo
36	FFAA	F	21	negativo	negativo	negativo
37	RTSM	F	41	negativo	negativo	negativo
38	LAS	F	21	negativo	negativo	negativo
39	AJM	M	25	negativo	negativo	negativo
40	PGM	F	30	negativo	negativo	negativo

(+) positivo

Tabela 5 - Distribuição de títulos de IgG detectados pelos testes IFI e ELISA em 80 amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase e 100 amostras de soro controles.

Amostras de Soro	Títulos de IgG - I.F.I.										Total	
	n	<20	20	40	80	160	320	640	1280	2560	n	%
<i>S. stercoralis</i>	80	8	15	13	18	18	3	2	2	1	72	90,0
Outras parasitoses	60	60									0	0,0
Controles sadios	40	40									0	0,0

Amostras de Soro	Títulos de IgG - ELISA						Total	
	n	<40	40	80	160	320	n	%
<i>S. stercoralis</i>	80	0	22	36	16	6	80	100,0
Outras parasitoses	60	58	2				2	3,3
Controles sadios	40	40					0	0,0

#### 4.4 Teste "Western blotting"

O teste "Western blotting" foi realizado utilizando conjugado de cabra anti-IgG humana marcada com peroxidase (cadeia total, SIGMA, USA). A titulação do conjugado foi realizada pelo teste ELISA com concentração protéica de 10 µg/ml, amostras de soro reagente e não reagente reconhecidas pela IgG no título de 2000, sendo definido para o teste de "Western blotting" o título ideal de 200.

A Figura 1 ilustra as frações antigênicas imunodominantes visualizadas pelo teste "Western blotting" em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, indivíduos sadios e pacientes com outras parasitoses frente ao extrato salino de *S. ratti*, além de reconhecer peptídeos imunodominantes coincidentes com as amostras de soro dos pacientes pertencentes a amostra de soro de coelho normal e outra amostra de gamaglobulina de coelho imunizado com *S. ratti*.

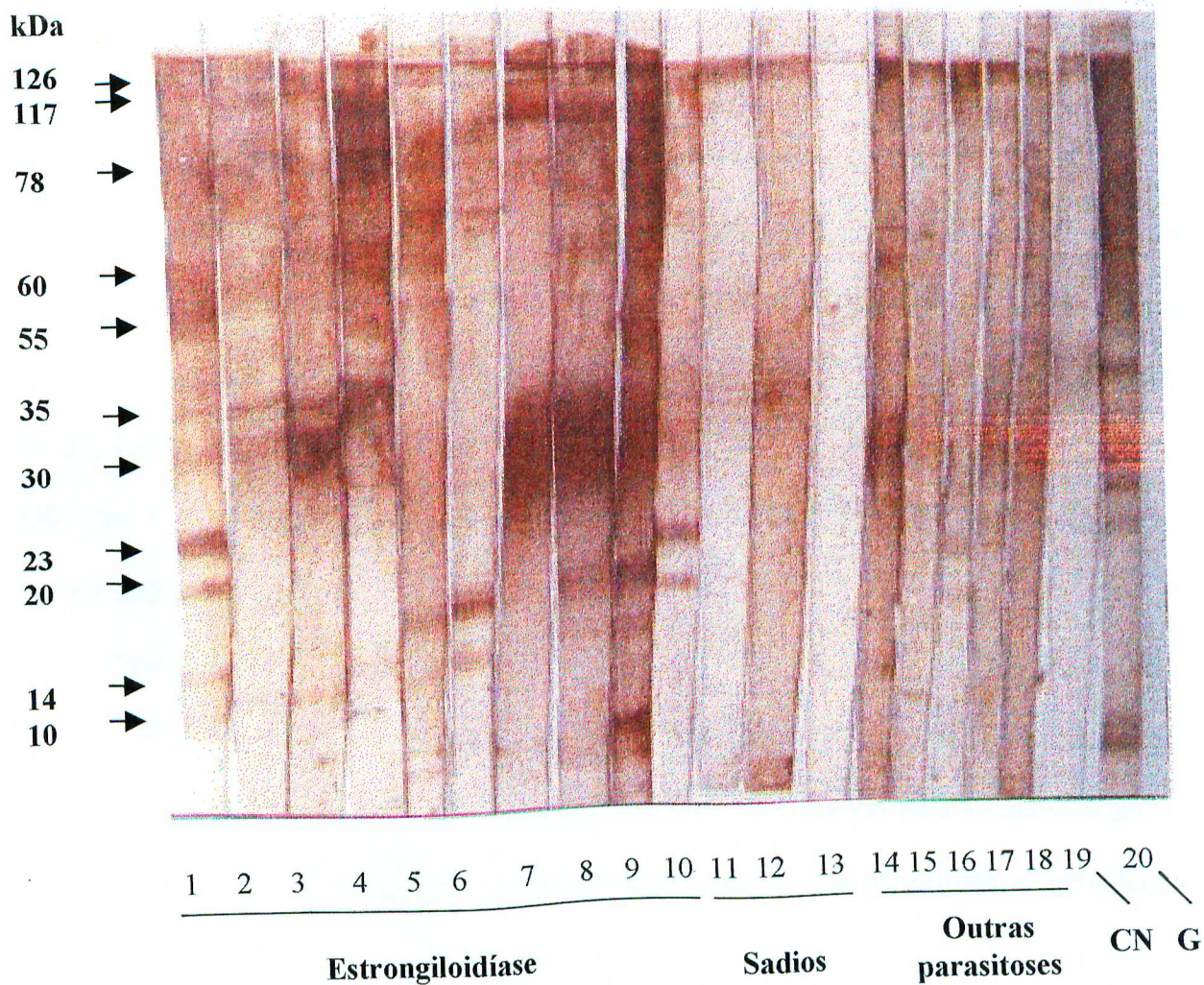


Figura 1 – Visualização das frações antigênicas imunodominantes por “Western blotting” utilizando extrato salino de *S. ratti* em amostras de soro (1:40) de pacientes com estrongiloidíase (pistas 1-10), indivíduos sadios (pistas 11-13), pacientes com outras parasitoses (pistas 14-18), amostra de soro de coelho normal (pista 19) e amostra de gamaglobulina de coelho imunizado com *S. ratti* (pista 20).

## 4.5 Avaliação do teste "Western blotting"

### 4.5.1 Avaliação da especificidade do extrato antigênico

Os peptídeos reconhecidos pelo anticorpo IgG anti-*S. ratti* das amostras de soro no extrato antigênico estudado foi expresso segundo o seu peso molecular aparente. Foram reconhecidas trinta e sete frações antigênicas correspondentes a: 8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 37, 40, 44, 46, 48, 52, 55, 60, 66, 70, 75, 78, 81, 85, 89, 90, 91, 97, 105, 113, 117, 122, 126, 132, 138, 141 e 148kDa. Para cada peptídeo foi calculado a frequência encontrada em cada grupo estudado.

Destas frações, vinte e duas (8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 46, 55, 60, 70, 78, 81, 85, 90, 105, 117, 126 e 138kDa) foram imunodominantes nos pacientes com estrongiloidíase, sendo as sua frequências estatisticamente significativas para a diferença entre duas proporções ( $p < 0,05$ ), com relação aos pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios.

Os pacientes com outras parasitoses apresentaram as frações antigênicas: 14, 20, 23, 33, 35, 37, 40, 44, 48, 52, 60, 66, 75, 78, 81, 85, 89, 91, 97, 113, 117, 122, 126, 132 e 148kDa. E nos indivíduos sadios as frações antigênicas foram: 20, 23, 26, 30, 33, 35, 37, 40, 44, 46, 48, 66, 91, 97, 138 e 141kDa. As Tabelas 6, 7 e 8 mostram as frequências das frações antigênicas nos pacientes com estrongiloidíase, pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios, respectivamente.

Tabela 6 - Frequências de 22 frações antigênicas do extrato salino de *S. rattii* reconhecidas por IgG em 80 amostras de soro, com diagnóstico comprovado de estrogiloidíase, através do teste de "Western Blotting".

Fração antigênica (kDa)	Positividade		IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS Pacientes com estrogiloidíase	
	n	%		
8*	11	13,7		36, 39, 41, 47, 53, 61, 63, 64, 65, 67, 74
10*	36	45,0		10, 11, 12, 14, 27, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 74, 75, 78, 79
14*	36	45,0	3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 26, 27, 28, 29,	33, 34, 35, 36, 37, 39, 41, 44, 45, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 78
17*	37	46,2		10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 28, 29, 31, 35, 37, 41, 43, 44, 45, 47, 49, 54, 55, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 72, 74, 75, 76, 77
20*	31	38,7	14, 13, 16, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 36, 38, 53, 55, 56, 57,	58, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 72, 74, 75, 76, 77
23*	18	22,5		10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 23, 26, 29, 30, 33, 37, 39, 51, 56, 73
26*	27	33,7	7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 29, 32, 35, 41, 45, 47, 48, 49,	50, 52, 53, 54, 59, 70, 73, 74
30*	32	40,0	2, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 33, 34, 42, 43, 44, 58, 59, 60, 61,	62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77
33*	19	23,7		3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 28, 29, 30, 35, 36, 37,
35*	15	18,7		14, 15, 16, 17, 18, 19, 26, 27, 31, 33, 35, 38, 39, 69, 71
40	20	25,0		1, 9, 14, 15, 16, 17, 20, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 55, 56, 57, 70, 80
44	8	10,0		13, 14, 18, 21, 23, 35, 51, 66
46*	19	23,7		1, 2, 6, 9, 13, 16, 21, 22, 24, 26, 29, 35, 36, 40, 41, 54, 65, 71, 78
55*	25	31,2	1, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 22, 31, 33, 35, 37, 42, 45, 47, 48, 49, 51, 54,	56, 57, 59, 61, 67, 76
60*	15	18,7		13, 16, 18, 23, 26, 29, 33, 35, 38, 39, 54, 64, 66, 71, 74
66	12	15,0		13, 19, 21, 28, 42, 49, 57, 59, 61, 66, 72, 74
70*	13	16,2		19, 21, 23, 29, 35, 36, 37, 39, 45, 46, 47, 48, 49
78*	16	20,0		4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 28, 33, 34, 36, 51, 56
81*	26	32,5	4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 27, 28, 30, 42, 45,	46, 47, 59, 64, 65, 71
85*	25	31,2	3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 37, 38, 41, 43, 45, 48, 49,	50, 51, 52, 53, 54, 78
90*	10	12,5		20, 21, 22, 23, 28, 29, 40, 42, 46, 63
97	12	15,0		2, 20, 23, 24, 26, 39, 40, 47, 49, 63, 67, 75
105*	17	21,2		21, 25, 36, 38, 45, 56, 57, 59, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 72, 74, 78
117*	17	21,2		21, 28, 29, 33, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 73, 75
126*	23	28,7	21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 45, 60, 63,	70, 71, 72, 78, 79
132	4	5,0 <sup>o</sup>		39, 41, 44, 54
138*	23	28,7	20, 42, 43, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 62, 64, 65, 68, 69,	70, 74, 76, 77, 80
141	8	10,0		60, 61, 63, 64, 66, 67, 74, 75

\*Frações antigênicas imunodominantes estatisticamente significante entre as amostras de soro dos pacientes com estrogiloidíase quando comparados com os pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios

Tabela 7 - Frequências de 25 frações antigênicas do extrato salino de *S. ratti* reconhecidas por IgG em 60 amostras de soro de pacientes com outras parasitoses através do teste de "Western blotting"

Frações antigênicas (kDa)	Positividade		IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS Pacientes com outras parasitoses
	n	%	
14*	4	6,7	6, 16, 21, 53
20*	3	5,0	12, 13, 31
23*	1	1,7	31
33*	3	5,0	7, 19, 49
35*	2	3,3	6, 40
37	4	6,7	8, 22, 31, 49
40	3	5,0	12, 13, 20
44	9	15,0	9, 15, 16, 17, 20, 22, 25, 32, 40
48	1	1,7	31
52	2	3,3	7, 31
60*	2	3,3	26, 31
66	4	6,7	1, 31, 35, 48
75	5	8,3	1, 12, 13, 31, 35
78*	1	1,7	49
81*	1	1,7	48
85*	4	6,7	12, 19, 33, 49
89	3	5,0	10, 13, 26
91	7	11,7	25, 33, 41, 48, 52, 59, 60
97	3	5,0	31, 33, 42
113	6	10,0	6, 19, 21, 28, 31, 58
117*	1	1,7	6
122	4	6,7	8, 24, 28, 39
126*	2	3,3	4, 5
132	2	3,3	7, 21
148	14	23,3	10, 12, 13, 14, 17, 26, 27, 32, 33, 43, 48, 49, 55, 59

\*Frações antigênicas imunodominantes estatisticamente significante entre as amostras de soro dos pacientes com estrogiloidíase quando comparados com os pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios

Tabela 8 - Frequências de 16 frações antigênicas do extrato salino de *S. ratti* reconhecidas por IgG em 40 amostras de soro de indivíduos sadios através da técnica de "Western blotting"

Frações antigênicas (kDa)	Positividade		IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS Indivíduos Sadios
	n	%	
20*	2	5,0	14, 16
23*	2	5,0	13, 28
26*	1	2,5	12
30*	2	5,0	2, 4
33*	2	5,0	1, 3
35*	1	2,5	3
37	2	5,0	3, 13
40	4	10,0	3, 4, 11, 16
44	2	5,0	3, 4
46*	1	2,5	4
48	3	7,5	4, 11, 23
66	1	2,5	32
91	1	2,5	12
97	4	10,0	4, 5, 6, 24
138*	1	2,5	5
141	1	2,5	2

\*Frações antigênicas imunodominantes estatisticamente significante entre as amostras de soro dos pacientes com estrogiloidíase quando comparados com os pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios

As frequências das frações antigênicas do extrato salino foram analisadas comparativamente pelo teste de diferença entre duas proporções para os grupos de pacientes obtidos. Admitindo-se erro máximo de 5%. A Figura 2 demonstra a frequência de reconhecimento de marcadores antigênicos (kDa) em 180 amostras de soro: 80 pacientes com estrogiloidíase, 60 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios; diluídos 1:40, testados por "Western Blotting" para detecção de IgG em extrato salino *S. ratti*.

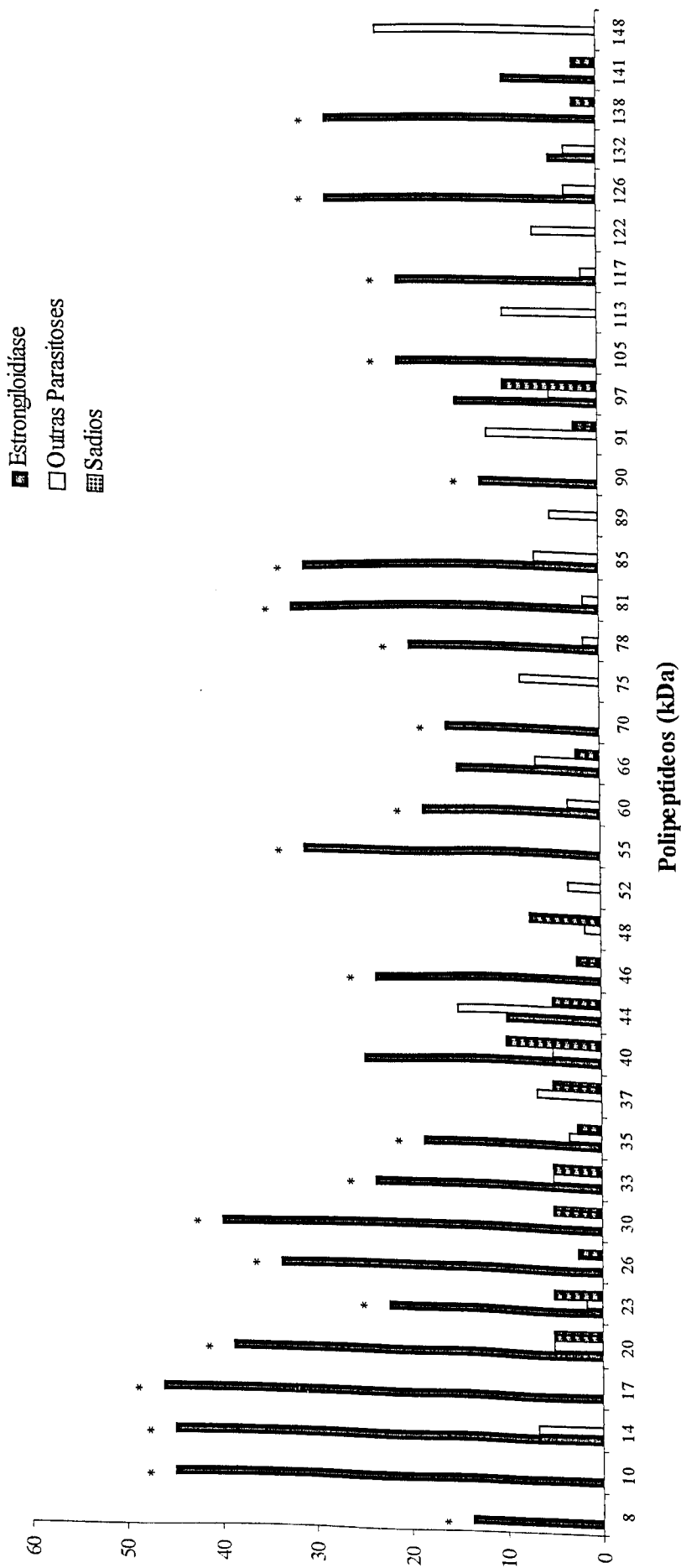


Figura 2 - Frequência do reconhecimento de marcadores antigênicos (kDa) em 180 amostras de soro: 80 de pacientes com estrongiloidiase, 60 de pacientes com outras parasitoses e 40 de indivíduos sadios; diluídas 1:40, testadas por "Western Blotting" para detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* em extrato salino de *S. ratti*. \* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de soro dos pacientes com estrongiloidiase comparados com os pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios.



No teste "Western Blotting" realizado com amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios, foram analisadas as frequências dos peptídeos imunodominantes e foram determinados três critérios de positividade. Considerou-se como indicativo de estrogiloidíase, ou no mínimo exposição à *Strongyloides stercoralis*, as amostras de soro que reconheceram de um ou mais peptídeos imunodominantes (critério 1); de dois ou mais peptídeos imunodominantes (critério 2) e três ou mais peptídeos imunodominantes (critério 3).

A sensibilidade e especificidade desses critérios estão mostrados na Tabela 9. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as sensibilidades dos três critérios e quando comparadas as especificidades dos critérios 1 x 2 e 1 x 3. Portanto considerou-se o critério 2 como positividade por diminuir a frequência de falsos positivos (especificidade 93%) e apresentar alta sensibilidade (98,7%).

Tabela 9 - Comparação entre as sensibilidades e a especificidades do teste "Western blotting" na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* determinando como critério de positividade 1, 2 e 3 quando, respectivamente, um ou mais, dois ou mais e três ou mais peptídeos imunodominantes são reconhecidos por amostras de soro de 80 pacientes com estrogiloidíase, 60 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios.

Critério	Número de positivos/total	Sensibilidade (%)	Número de negativos/total	Especificidade (%)
1	80/80	100,0*	74/100	74,0**
2	79/80	98,7*	93/100	93,0
3	73/80	91,0*	97/100	97,0***

\*Diferença estatisticamente significativa quando comparadas as sensibilidades

\*\*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com critério 2

\*\*\*Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o critério 1

#### 4.6 Comparações entre os testes I.F.I., ELISA e "Western Blotting" na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* utilizando extrato salino de *S. ratti* em amostras de soro

Na Tabela 10 observam-se os resultados concordantes e discordantes entre os três testes imunológicos realizados em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, pacientes com outras parasitoses e indivíduos sadios.

Nos pacientes com estrogiloidíase houve concordância positiva de 90,0% e discordância de 10,0% (1,2% para I.F.I.-/ELISA+/WB- e 8,8% para I.F.I.-/ELISA+/WB+). Os pacientes com outras parasitoses apresentaram somente concordância negativa de 91,7% e discordância 8,3% (5,0% para I.F.I.-/ELISA-/WB+ e 3,3% para I.F.I.-/ELISA+/WB+). Entretanto, os indivíduos sadios apresentaram concordância negativa de 95,0% e discordância de 5,0% para I.F.I.-/ELISA-/WB+.

Tabela 10 - Análise comparativa entre os resultados dos testes I.F.I., ELISA e "Western Blotting" na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* utilizando extrato salino de *S. ratti* em 80 amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, 60 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios.

Testes	Pacientes com estrogiloidíase		Pacientes com outras parasitoses		Indivíduos sadios	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>Concordantes</b>						
I.F.I.+ / ELISA+ / WB+	72	(90,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
I.F.I.- / ELISA- / WB-	0	(0,0)	55	(91,7)	38	(95,0)
<b>Discordantes</b>						
I.F.I.+ / ELISA+ / WB-	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
I.F.I.+ / ELISA- / WB-	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
I.F.I.+ / ELISA- / WB+	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
I.F.I.- / ELISA- / WB+	0	(0,0)	3	(5,0)	2	(5,0)
I.F.I.- / ELISA+ / WB+	7	(8,8)	2	(3,3)	0	(0,0)
I.F.I.- / ELISA+ / WB-	1	(1,2)	0	(0,0)	0	(0,0)
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>(100)</b>	<b>60</b>	<b>(100)</b>	<b>40</b>	<b>(100)</b>

(+) teste positivo; (-) teste negativo

A Figura 3 compara as sensibilidades dos testes I.F.I., ELISA e “Western Blotting” (WB) mostrando que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando compararam-se as sensibilidades dos testes I.F.I. x “Western Blotting” e I.F.I. x ELISA. Havendo diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre as especificidades dos testes I.F.I. x “WB”.

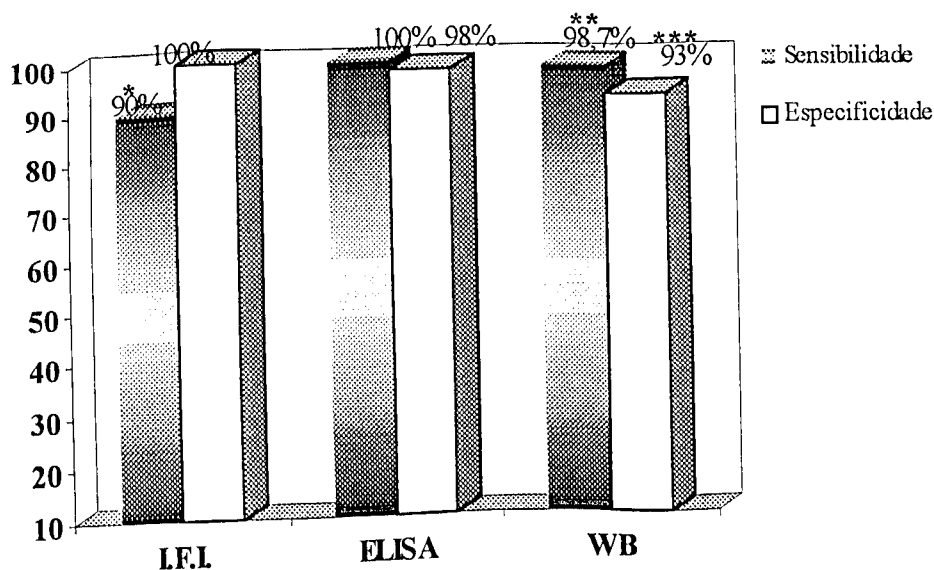


Figura 3 – Comparação entre as sensibilidades e especificidades dos testes I.F.I., ELISA e “Western Blotting” (WB) na detecção de IgG anti-*S. stercoralis* utilizando extrato salino de *S. ratti* em amostras de soro de 80 pacientes com estrogiloidíase, 60 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as sensibilidades \*I.F.I. x ELISA e \*\*I.F.I. x WB e as especificidades para \*\*\*I.F.I. x WB.

## 5. DISCUSSÃO

Os métodos imunológicos são úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro nos casos de formas assintomáticas e no esclarecimento do diagnóstico clínico, além da possibilidade de emprego em inquéritos soropidemiológicos por apresentarem elevada sensibilidade com relação aos métodos parasitológicos (COSTA-CRUZ, 2000).

A maior limitação encontrada na padronização de testes imunológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade de se obter quantidades suficientes de larvas filarióides de *S. stercoralis*, situação vencida com sucesso pelo emprego de *S. ratti*, *S. venezuelensis* e *S. cebus* como fontes alternativas de antígenos heterólogos (GROVE, BLAIR, 1981; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; COSTA-CRUZ, 2000).

Tendo em vista que foram utilizadas 288.000 larvas, obtendo-se uma concentração protéica de 1300 µg/ml, a utilização do antígeno heterólogo contribuiu expressivamente para a realização dos testes de ELISA e “Western blotting”, uma vez que, para obtenção dessa quantidade de larvas, seria preciso muitos pacientes infectados, eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes. A utilização de *S. ratti* mantido em roedores tem auxiliado nos estudos de biologia molecular, interação parasito-hospedeiro, ensaios terapêuticos e fonte de antígeno heterólogo para padronização de novas técnicas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ, 2000).

Neste trabalho, a utilização do extrato salino de *S. ratti* alcançou resultados promissores no teste “Western blotting” para detecção de IgG sérica no diagnóstico da estrogiloidíase humana. Apesar da facilidade de obtenção das larvas de *S. ratti*, nenhum trabalho, até o momento, foi publicado no Brasil utilizando extrato salino de *S. ratti* em amostras de soro humano pelo teste de “Western blotting” e, na literatura estrangeira, somente os resultados obtidos por CONWAY *et al.*, (1994) não demonstraram peptídeos

imunodominantes utilizando extrato de *S. ratti*. Estudos têm sido realizados com extrato salino de *S. stercoralis* por grupos de pesquisadores do Japão e EUA (Quadro 3) valorizando, assim, a importância deste trabalho como pioneiro na caracterização de peptídeos imunodominantes pelo teste de "Western blotting" utilizando extrato salino de *S. ratti*.

A análise da gamaglobulina de coelho pelo "Western blotting" demonstrou 14 frações antigênicas, coincidentes com amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, com outras parasitoses ou indivíduos sadios. Os peptídeos imunodominantes 14, 17, 20, 30, 35, 55 e 78 kDa foram reconhecidos pela gamaglobulina do soro de coelho imune. Na amostra de soro do coelho normal as frações antigênicas 52 e 148 kDa coincidiram com as detectadas nas amostras de soro dos indivíduos sadios e as 75 e 89 kDa com as amostras de soro de pacientes com outras parasitoses confirmam a representatividade das frações antigênicas encontradas.

O teste "Western blotting" combina a resolução minuciosa da eletroforese em gel de poliacrilamida com a alta sensibilidade de detectar anticorpos do ensaio enzimático (LARRALDE *et al.*, 1989). Estes testes têm sido aplicado no imunodiagnóstico da estrogiloidíase como alternativo para confirmar o diagnóstico, por ser uma técnica altamente sensível e específica no reconhecimento de frações de larvas filarióides de *S. stercoralis* (UPARANUKRAW, PHONGSRI, MORAKOTE, 1999).

Neste trabalho, o "Western blotting" reconheceu 28 marcadores antigênicos, em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, utilizando extrato salino de *S. ratti*. Destas, foram consideradas imunodominantes, pela análise estatística, 22 frações protéicas (8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 46, 55, 60, 70, 78, 81, 85, 90, 105, 117, 126 e 138 kDa). Apesar destes peptídeos imunodominantes não terem sido descritos em conjunto na literatura, vários autores, estudando antígeno salino de *S. stercoralis* em amostras de soro, encontraram resposta de IgG para dez (17, 20, 23, 26, 30, 33, 46, 55, 78 e 90 kDa) dos peptídeos imunodominantes detectadas por este estudo (GENTA *et al.*, 1988; GENTA, LILLIBRIDGE,

1989; SATO *et al.*, 1990; ATKINS *et al.*, 1999).

Os peptídeos imunodominantes 20, 26, 30, 70 e 105 kDa podem corresponder às 19 e 21, 28, 31, 72 e 100 kDa descritos na literatura, aumentando de dez para 16 proteínas imunodominantes concordantes (Quadro 3).

Os peptídeos imunodominantes 8, 10, 14, 105, 117, 126 e 138 kDa são descrições inéditas na literatura, sugerindo serem peptídeos do antígeno heterólogo, confirmadas pelo padrão de reconhecimento da gamaglobulina do coelho imune (Figura 1).

As frações protéicas 28, 31 e 41 kDa foram relatadas por vários autores como imunodominantes para o diagnóstico da estrogiloidíase humana em amostras de soro (CONWAY *et al.*, 1993b; LINDO *et al.*, 1994; CONWAY *et al.*, 1994; UPARANUKRAW, PHONGSRI, MORAKOTE, 1999); porém, não foram encontradas neste estudo. Dados de CONWAY *et al.* (1994) utilizando várias espécies de *Strongyloides* determinaram que estas frações estavam ausentes no *S. ratti*.

Os peptídeos 26, 41, 66 e 97kDa presentes no extrato salino de *S. stercoralis* foram identificados por SATO *et al.*, 1990. Os resultados deste trabalho discordam em relação à fração antigênica 41kDa que não foi encontrada na análise do "Western blotting" utilizando o extrato salino de *S. ratti*. Recentemente, a fração antigênica 41kDa está sendo utilizada como material para uma biblioteca de cDNA, propondo a purificação de antígenos recombinantes heterólogos para o desenvolvimento de testes imunodiagnóstico (SIDDIQUI, STANLEY, BERK, 2000).

Várias peptídeos de superfície das larvas filarióides de *S. stercoralis* foram demonstrados por BRINDLEY *et al.* (1988), incluindo a de 30kDa, e vários produtos de excreção/secreção larval como 40, 30 e 25 kDa reconhecidos por anticorpos em "pool" de amostras de soro humano infectado, concordando com os resultados deste trabalho onde as frações antigênicas 30 e 40 kDa apresentaram, respectivamente, as seguintes frequências de

40% e 25% e, a fração antigênica de 25 kDa pode corresponder à de 26 kDa (33,7%) reconhecidas aqui.

A IgG4 foi estudada quanto à resposta imune por GENTA, LILLIBRIDGE, 1989 determinando as frações 46, 72 e 78kDa como imunodominantes pelo "Western blotting", sugerindo que subclasse da imunoglobulina G pode ter um papel em modular resposta alérgica às proteínas parasitárias específicas de *S. stercoralis*.

A identificação de peptídeos encontrados pelo teste de "Western blotting" é efetuado por cálculos de pesos moleculares aparentes. Dependendo das variáveis envolvidas no sistema, não se deve excluir a possibilidade de uma mesma proteína ser expressa por valores em kDa, muito próximos em diferentes trabalhos (GERSHONI, 1988).

O reconhecimento de IgG, pelas amostras de soro, apresentaram um valor mínimo de especificidade (93%), ao se considerar dois ou mais peptídeos imunodominantes (critério 2) em relação a um ou mais peptídeos imunodominantes (critério 1). A sensibilidade (98,7%) foi alta como aquelas reportadas para o ELISA e I.F.I. (Quadros 1 e 2). Portanto, o critério 2 diminui possíveis casos falso-positivos, sem alterar a sensibilidade do teste.

Comparando-se o antígeno utilizado, observou-se que a concordância nos três testes tanto positiva para os pacientes com estrogiloidíase (90,0%), quanto negativa para os pacientes com outras parasitoses (91,7%) e indivíduos sadios (95,0%), foi significativa em detectar IgG sérica, reforçando a necessidade da associação dos testes imunológicos, para um diagnóstico confirmativo, diminuindo os resultados falso-positivos .

Nos casos onde houve discordância dos testes I.F.I. e ELISA (I.F.I./ELISA+), o "Western blotting" foi capaz de definir o diagnóstico em oito casos (10,0%) de pacientes com estrogiloidíase, e dois casos (3,3%) de pacientes com outras parasitoses, sugerindo que, em casos semelhantes deve-se realizar o teste de "Western blotting", para confirmar o diagnóstico.

Um das principais limitações encontradas na utilização do imunodiagnóstico é a possibilidade de haver reações cruzadas com outras parasitoses, principalmente esquistossomose, filariose e ancilostomose. Este problema pode ser solucionado pela caracterização das frações antigênicas específicas de *Strongyloides*, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e seu emprego como antígeno purificado, ou análise das amostras de soro pelo teste de “Western blotting”, para identificação de peptídeos imunodominantes específicas (COSTA-CRUZ, 2000).

Os pacientes com outras parasitoses apresentaram três casos (5,0% dois casos com Ancilostomídeo e um caso com *Trichuris trichura*) para “Western blotting” positivo e I.F.I. e ELISA negativo, havendo possível reação cruzada. Nos indivíduos sadios houve dois casos (5,0%) na mesma situação, sugerindo que o “Western blotting” não é capaz de confirmar um diagnóstico onde o testes de triagem foram negativos. Os dois casos (5,0%) nos indivíduos sadios podem sugerir casos de estrogiloidíase, em que os indivíduos não estavam eliminando larvas nas fezes.

Quando se compararam as sensibilidades e especificidades, nos três testes, obteve-se maior sensibilidade para o ELISA (100%) seguidos pelo “Western blotting” (98,7%) e pela I.F.I. (90%), enquanto as especificidades foram, respectivamente em ordem decrescente, I.F.I. (100%), ELISA (98%) e “Western blotting” (93%). Isto demonstra que a sensibilidade e a especificidade, associando os testes, tornam o diagnóstico da estrogiloidíase mais específico.

O teste “Western blotting” utilizando extrato salino de *S. ratti* detectaram IgG principalmente as frações antigênicas 8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 46, 55, 60, 70, 78, 81, 85, 90, 105, 117, 126 e 138kDa, mostrando-se eficaz como teste complementar para o diagnóstico e pode ser útil na confirmação parasitológica, da presença de infecção, dificultada pelo pequeno número de larvas de *S. stercoralis* eliminadas nas fezes. Pode ser útil em casos de desenvolvimento da estrogiloidíase severa, pela supressão da imunidade celular através

de corticóides e outros drogas (Lin, Weller 93

Keung, Lee, Sung 9



de corticóides e outras drogas (LIU, WELLER, 1993; LEUNG, LIEW, SUNG, 1997).

Por fim, a presente dissertação sugere que a combinação dos testes I.F.I., ELISA e “Western blotting” em amostras de soro podem fornecer resultados mais seguros para auxílio na confirmação do diagnóstico da estrogiloidíase humana.

## 6. CONCLUSÕES

O extrato salino de *S. ratti* mostrou-se eficiente no teste “Western blotting” para detecção de IgG sérica no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

As frações protéicas 8, 10, 14, 17, 20, 23, 26, 30, 33, 35, 46, 55, 60, 70, 78, 81, 85, 90, 105, 117, 126 e 138kDa foram consideradas imunodominantes no teste “Western blotting” para o extrato salino de *S. ratti* na detecção de IgG sérica.

O extrato salino de *S. ratti* apresentou índices elevados tanto em sensibilidade quanto em especificidade nos testes I.F.I., ELISA e “Western blotting” analisados na detecção de IgG sérica no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

O teste de “Western blotting” foi capaz de definir o diagnóstico em casos de sorologia discordantes (I.F.I. - e ELISA +) sugerindo sua utilização nestes casos para esclarecer o diagnóstico imunológico.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- ABBAS, K.A., LICHTMAN, H.A., POBER, S.J. *Imunologia Celular e Molecular*, 3º ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.305-307, 2000.
- AL SAMMAN, M., SALIMA, H., LONG, J.D. Strongyloidiasis colitis: a case report and review of the literature. *Journal of Clinical and Gastroenterology*, v. 28, p. 77-80, 1999.
- ANDRADE NETO, J.L. de, ASSEF, M.C.V. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Eds.). *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. 1803p. p.1373-1378.
- ARAKAKI, T., IWANAGA, M., KINJO, F., SAITO, A., ASATO, R., IKESHIRO, T. Efficacy of plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Parasitology*, v.76, p.425-428, 1990.
- ATKINS, N.S., LINDO, J.F., LEE, M.G., CONWAY, D.J., BAILEY, J.W., ROBINSON, R.D., BUNDY, D.A.P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 609-613, 1997.
- ATKINS, N.S., CONWAY, D.J., LINDO, J.F., BAILEY, J.W., BUNDY, D.P.A. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. *Parasite Immunology*, v. 21 p. 517-526, 1999.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoben. Mededeel. nnith. in. Geneesk. . *Laboratories Weltre Feestbundel, Batavia*, p.41-47, 1917.
- BAILEY, J.W. A serological test for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* antibodies in ex far east prisoners of war. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 83, p. 241-247, 1989.
- BARNISH, G., ASHFORD, R.W. *Strongyloides fulleborni* in Papua New Guinea: epidemiology in an isolated community and results of an intervention study. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.83, p.499-506, 1989.
- BASSI, G.E., ISHIKI, D.K., FERREIRA, A.W., CAMARGO, M.E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano - considerações sobre o limiar de reatividade. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, v.27, p.49-52, 1991.
- BERJAK, B. Immunoglobulin studies in strongyloidiasis with special reference to raised serum IgE levels. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.24, p.945-948, 1975.

\*Segundo Normas da ABNT NBR 6023/1989 (referência bibliográfica).

- BOLLA, R.I., ROBERTS, L.S. Gametogenesis and chromosomal complement in *Strongyloides ratti* (Nematoda: Rhabdiasoidea). **Journal of Parasitology**, v.54, p.849-855, 1968.
- BOURÉE, P., TAUGOURDEAU, A., BARTHELÉMY, M., PEQUIGNOT-RICOME, H., PASSERON, J., BOUVIER, J.B. Anguillulose: analyse clinique biologique et epidemiologique de 350 observation. **Nouveau Presse Medicine**, v.10, p.679-681, 1981.
- BRASIL, R., BADARÓ, R., ANDRADE, J.A.F., ANDRADE, T.M., CARVALHO, E.M. Diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana pelo método imunoenzimático. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.21, p.139-143, 1988.
- BRASITUS, T.A., GOLD, R.P., KAY, R.H., MAGUN, A.M., LEE, W.M. Intestinal strongyloidiasis. A case report and review of the literature. **American Journal of Gastroenterology Latinoamerican**, v.73, p.65-69, 1980.
- BRINDLEY, P.J., GAM, A.A., PEARCE, J., POINDEXTER, R.W., NEVA, F.A. Antigens from the surface and excretion/secretions of the filariform larva of *Strongyloides stercoralis*. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v.28, p.171-180, 1988.
- CAMPOS, D.M.B., OLIVEIRA, O.S., BARBOSA, W., CAMPOS, M.L.L., ROSA, Z.S., SOUZA, O.C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico de estrogiloidíase humana. **Revista de Patologia Tropical**, v.17, p.17-23, 1988.
- CARROL, S.M., KARTHIGASU, K.T., GROVE, D.I. Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.706-709, 1981.
- CELEDON, J.C., MATHUR-WAGH, U., FOX, J., GARCIA, R., WIEST, P.M. Systemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and review of the literature. **Medicine**, v.73, p. 256-263, 1994.
- CHAVES-BORGES, F.A., MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55pp.
- CHIODINI, P.L., REID, A.J., WISELKA, M.J., FIRMIN, R., FOWERAKER, J. Parenteral ivermectin in *Strongyloides* hyperinfection. **Lancet**, v. 355, p.43-44, 2000.
- CONWAY, D.J., ATKINS, N.S., LILLYWHITE, J.E., BAILEY, J.W., ROBINSON, R.D., LINDO, J.F., BUNDY, D.A.P., BIANCO, A.E. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, p.173-176, 1993a.
- CONWAY, D.J., BAILEY, J.W., LINDO, J.F., ROBINSON, R.D., BUNDY, D.A.P., BIANCO, A.E. Serum IgG reactivity with 41-,31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.168, p.784-787, 1993b.

- CONWAY, D.J., LINDO, J.F., ROBINSON, R.D., BUNDY, D.A.P., BIANCO, A.E. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Experimental Parasitology**, v.79, p.99-105, 1994.
- COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P., de MELO, A. L., GENARO, O., LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10 ed., Atheneu p.247-258, 2000.
- COSTA-CRUZ, J.M, FERNANDES, O., VIOLA, J.P., SILVA, S.P., PASSOS, R.H., LIMA, D.B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patient in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 527-533, 1989.
- COSTA-CRUZ, J.M., BULLAMAH, C.B., GONÇALVES-PIRES, M.R.F, CAMPOS, D.M., VIEIRA, M.A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, p.313-317, 1997.
- COSTA-CRUZ, J.M., SILVA, L.P., GONÇALVES-PIRES, M.R.F., CAMPOS, D.M.B., Comparação entre os testes de Imunofluorescência Indireta e ELISA extrato salino na detecção de anticorpos IgG utilizando antígeno de *Strongyloides ratti*, no diagnóstico da estrogiloidíase humana. IN: **Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 1999a, p.15.
- COSTA-CRUZ, J.M., COSTA, I.N., GONÇALVES-PIRES, M.R.F., BARCELOS, I.S.C., CAMPOS, D.M.B., FERREIRA, M.S. Estudo comparativo de dois extratos antigênicos heterólogos na detecção de anticorpos IgA anti-*S. stercoralis* pelo teste ELISA em amostras de soro. IN: **XII Semana Científica de Medicina**, Uberlândia, 1999b, p.20.
- COSTA-CRUZ, J.M., MADALENA, J., SILVA, D.A.O., SOPELETE, M.C., CAMPOS, D.M.B., TAKETOMI, E.A. Determinação de IgE específica e total por ELISA em amostras de soro na estrogiloidíase humana. IN: **VII Congresso Brasileiro de Biomedicina**, Goiânia, 2000, p.15.
- COUDERT, J., AMBROISE-THOMAS, P., KIEN TRUONG, T.H.A.I., POTHIER, M.A., Diagnostic serologique de anguillulose humaine par immunofluorescence (resultats preliminaires). **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**, v.61, p.74-80, 1968.
- CROMPTON, D.W.T. Balliere Tindall. In: **Balliere's Clinical Tropical Medicine & Communicable Diseases**, vol. 2, Ed. ZS Pawloski, London. 1987.
- DAFFALA, A.A. The indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.109-111, 1972.
- De KAMINSKY, R.G. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 277-280, 1993.
- De MESSIAS, I.T., TELLES, F.Q., BOARETTI, A.C., SLIVA, S., GUIMARRES, L.M., GENTA, R.M. Clinical, immunological and epidemiological aspects of strongyloidiasis an in endemic area of Brazil. **Allergologia et Immunopathologia**, v.15, p.37-41, 1987.

- De PAULA F.M., CASTRO E., GONÇALVES-PIRES, M.R.F., MARÇAL, M.G., CAMPOS, D.M.B., COSTA-CRUZ, J.M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, p.51-55, 2000.
- DREYER, G., FERNANDES-SILVA, E., ALVES, S., ROCHA, A., ALBUQUERQUE, R., ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens – Implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2568-2571, 1996.
- FERREIRA, M.S. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCACCIA, R., DIETZE, R. (Eds.). **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.856-865.
- FERREIRA, M.S., NISHIOKA, A.S., BORGES, A.S., COSTA-CRUZ, J.M., ROSSIN, I.R., ROCHA, A., SILVESTRE, M.T.A., ARAÚJO, F.F.N. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v.28, n.1, p.154-155, 1999.
- GAM, A.A., NEVA, F.A., KROTOSKI, W.A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.37, p.157-161, 1987.
- GENTA, R.M. *Strongyloides stercoralis*: Immunobiological considerations on an unusual worm. **Parasitology Today**, v.2, p.241-246, 1986.
- GENTA, R.M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **American Journal of Clinical Pathology**, v.89, p.391-394, 1988.
- GENTA, R.M., WEIL, G.J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Laboratory Investigation**, v.47, p.87-90, 1982.
- GENTA, R.M., LILLIBRIDGE, J.P. Prominence of IgG4 antibodies in the human responses to *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v.160, p.692-699, 1989.
- GENTA, R.M., DOUCE, R.W., WALZER, P.D. Diagnostic implications of parasite-specific immune responses in immunocompromised patients with strongyloidiasis. **Journal of Clinical and Microbiology**, v.23, p.1099-1103, 1986.
- GENTA, R.M., MILES, P., FIELDS, K. Opportunistic *Strongyloides stercoralis* infection in lymphoma patients. **Cancer**, v.63, p.1407-1411, 1989.
- GENTA, R.M., GATTI, S., LINKE, M.J., CEVINI, C., SCAGLIA, M. Endemic strongyloidiasis in northern Italy: clinical and immunological aspects. **Quarterly Journal of Medicine**, v.68, p. 679-690, 1988.

- GERSHONI, J.M. Protein blotting: a manual. **Methods of Biochemistry Analysis**, v.33, p.1-58, 1988.
- GILL, G.V., BELL, D.R., FIFIELD, R. Lack of immunoglobulin E response to standing strongyloidiasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.37, p.292-294, 1979.
- GORDON, S.M., GAL, A.A., SOLOMON, A.R., BRYAN, J.A. Disseminated strongyloidiasis with cutaneous manifestations in an immunocompromised host. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.31, p.255-259, 1994.
- GROVE, D.I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v.38, p.251-309, 1996.
- GROVE, D.I., BLAIR, A.J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides stercoralis* and *S. ratti* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, p.344-349, 1981.
- HOFFMANN, W.A., PONS, J.A., JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico, **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v.9, p.283-291, 1934.
- KOBAYASHI, J., HASENGAWA, H., SOARES, E.C., TOMA, H., DACAL, A.R.C.D.O., BRITO, M.C., YAMANAKA, A., SATO, Y. Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holanda and Maceió Brazil, by the agar plate faecal culture method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.279-284, 1996.
- KOGA, K., KASUYA, S., KHAMBOONRUANG, C., SUKAVAT, K., IEDA, M., KITA, K., OHTOMO, H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.45, p.518-521, 1991.
- KOTHARY, N.N., MUSKIE, J.M., MATHUR, S.C. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **Radiographics**, v.19, p.1077-1081, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- LARRALDE, C., MONTOYA, R.M., SCUITTO, E., DIAZ, M.L., GOVEZENSKY, T., COLTORTI, E. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, p.282-290, 1989.
- LEÃO, R.C., TOLEDO BARROS, M.M., MENDES, E. Immunological study of human strongyloidiasis I: analysis of IgE levels. **Allergologia et Immunopathologia**, v.8, p.31-34, 1980.
- LEVINE, N.D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2<sup>a</sup>ed. Minneapolis: Burges, 1980.

- LEUNG, V.K.S., LIEW, C.T., SUNG, J.J.Y. Fatal strongyloidiasis in a patient with ulcerative colitis after corticosteroid therapy. *American Journal of Gastroenterology*, v.92, p.1383-1384, 1997.
- LINDO, J.F., CONWAY, D.J., ATKINS, N.S., BIANCO, A.E., ROBINSON, R.D., BUNDY, D.A.P. Prospective evaluation of Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.51, p.175-179, 1994.
- LINDO, J.F., ATKINS, N.S., LEE, M.G., ROBINSON, R.D., BUNDY, D.A. Short report: long-term serum antibody isotype responses to *Strongyloides stercoralis* filariform antigens in eight patients treated with ivermectin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.55, p.474-476, 1996.
- LIU, L.X., WELLER, P.F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.37, n.3, p.655-682, 1993.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.29, p.265-275, 1951.
- LUTZ, A.V. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.11, p.121-125, 1919.
- MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis* and others enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, p.161-164, 1998.
- MANNESCHI, L.I., DI-LOLLO, S., ORSI, A., TANI, A., PAPUCCI, A., ESPERTI, F., LEONCINI, F. *Strongyloides stercoralis*: Ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa. *Journal of Clinical Pathology*, 53, p.110-116, 2000.
- McRURY, J., DE MESSIAS, I.T., WALZER, P.D., HUITGER, T., GENTA, R.M. Specific IgE response in human strongyloidiasis. *Clinical Experimental Immunology*, v.65, p.631-638, 1986.
- MELTZER, R.S., SINGER, C., ARMSTRONG, D., MAYER, K., KNAPPER, W.H. Case report: Post mortem diagnosis of central nervous system strongyloidiasis. *American Journal of the Medical Sciences*, v.277, p.91-98, 1979.
- MORAES, R.G. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. *Revista do Serviço Especial em Saúde Pública*, v.1, p.507-524, 1948.
- MOURA, H., FERNANDES, O., VIOLA, J.P., SILVA, S.P., PASSOS, R.H., LIMA, D.B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patient in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 527-533, 1989.



- NEVA, F.A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 153, p.397-405, 1986.
- NEVA, F.A., GAM, A.A., BURKE, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v.144, p.427-432, 1981.
- NEVA, F.A., FILHO, J.O., GAM, A.A., THOMPSON, R., FREITAS, V., MELO, A., CARVALHO, E.M. Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.1856-1859, 1998.
- NEVES, D. P., de MELO, A. L., GENARO, O., LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 9ªed., Atheneu p.405-414, 1998.
- NEWTON, R.C., LIMPUANGTHIP, P., GREENBERG, S., GAM, A., NEVA, F.A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a carrier of HTLV-1 virus with evidence of selective immunosuppression. **American Journal of Medicine**, v.92, p.202-208, 1992.
- NIGON, V., ROMAN, E. Le déterminisme du sexe et le développement cyclique de *Strongyloides ratti*. **Bulletin Biologique Francé Belgica**, v.63, p.961-973, 1952.
- NOLETO, P.A., QUADRA, J.A.F., GUIMARÃES, H.A., LACERDA, P.R.S. Estrongiloidíase disseminada fatal: apresentação de 13 casos. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.59, p.59-69, 1990.
- NOMURA, J., REKRUT, K. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in a patient with AIDS: diagnosis by fluorescent microscopy. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.736, 1996.
- ONUIGBO, M.A.C., IBEACHUM, G.I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.97, 1991.
- PATERSON, S., FISHER, M.C., VINEY, M.E. Inferring infection processes of a parasitic nematode using population genetics. **Parasitology**, v.120, p.185-194, 2000.
- PATIL, P., JAYSHREE, R.S, ACHARYA, R.S., SRIDHAR, H., BABU, G., SURESH, T.M. Fulminant fatal *Strongyloides stercoralis* infection in a postchemotherapy immunosuppressed cancer patient. **Medical Pediatric Oncology**, v.5, p.504-505, 1999.
- PELLEGRINO, J., CHAIA, G., POMPEU MEMORIA, J.M. Observações sobre reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* em pacientes com estrongiloidíase. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p.181-186, 1961.
- PESSOA, S.B., MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

- PIRES, M.L., DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v.48, p.175-182, 1993.
- REY, L. *Bases da Parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 349p.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Imunologia*, 5 ed. São Paulo: Manole, 1999.
- ROSSI, C.L., TAKAHASHI, E.E.H., TEIXEIRA, A.L.S., MAZON-BARROS, S., TREVISAN, R.C.G. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.26, p.83-87, 1993a.
- ROSSI, C. L., TAKAHASHI, E. E., PARTEL, C. D., TEODORO, L. G., da SILVA, L. J. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.35, p.361-365, 1993b.
- SALAZAR, S.A., GUTIERREZ, C., BERK, S.L. Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.23, p.141-145, 1995.
- SANDGROUND, J.H. Speciation and specificity in the nematode genus *Strongyloides*. *Parasitology*, v.12, p.59-81, 1925.
- SATO, Y., KOBAYASHI, J., SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.37, p.35-41, 1995.
- SATO, Y., INOUE, F., MATSUYAMA, R., SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.84, p.403-406, 1990.
- SATO, Y., TOMA, H., KIYUNA, S., SHIROMA, Y. Gelatin particule indirect agglutination test for examination for strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.85, p.515-518, 1991.
- SATO, Y., KOBAYASHI, J., TOMA, H., SHIROMA, Y. Efficacy of stool examination for detection of strongyloidiasis infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.53, p.248-250, 1995.
- 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, p.668-671, 1999.
- SCOWDEN, E.B., SCHAFFNER, W., STONE, W.J. Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. *Medicine (Baltimore)*, v.57, p.527-544, 1978.

- SHARMA, B.C., BHASIN, D.K., MAKHARIA G., CHHABRA M., VAIPHEI K., BHATTI H.S., SINGH K. Diagnostic value of push-type enteroscopy: A report from India. *American Journal of Gastroenterology*, v.95, p.137-140, 2000.
- SIDDIQUI, A.A., KOENIG, N.M., SINENSKY, M., BERK, S.L. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. *Parasitology Research*, v.83, p.655-658, 1997.
- SIDDIQUI, A.A., STANLEY, C.S., BERK, S.L.A. cDNA encoding the highly immunodominant antigen of *Strongyloides stercoralis*: gamma-subunit of isocitrate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *Parasitology Research*, v.86, p.279-283, 2000.
- SIDDIQUI, A.A., STANLEY, C.S., SKELLY, P.J., BERK, S.L. A cDNA encoding a nuclear hormone receptor of the steroid/thyroid hormone-receptor superfamily from the human parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. *Parasitology Research*, v. 86, p.24-29, 2000.
- STUERCHLER, D. *Endemiegebiete tropischer infektionskrankheiten*. Bern, Hans. Huber, 1981. IN: PIRES, M.L., DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v.48, p.175-182, 1993.
- TAKAYANAGUI, O.M., LOFRANO, M.M., ARAÚJO, M.B.M., CHIMELLI, L. Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Neurology*, v.45, p.193-194, 1995.
- TARANTO, N.J. *Strongyloides stercoralis* report case and review of the literature. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, v.25, p.113-120, 1995.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.
- UPARANUKRAW, P., PHONGSRI, S., MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v.6, n.60, p.967-73, 1999.
- Van der FEELTZ, M., SLEE, P.H., van HEES, P.A., TERSMETTE, M. *Strongyloides stercoralis* infection: how to diagnose best?. *Neth Journal Medicine*, v.3, p.128-131, 1999.
- VINEY, M.E. A genetic analysis of reproduction in *Strongyloides ratti*. *Parasitology*, v.109, p.511-515, 1994.
- VINEY, M.E. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitology Today*, v.15, p.231-235, 1999.

- Von SAMSON, H.G., HARDER, A., SCHNIEDER, T., KALBE, J., MENCKE, N. *In vivo* activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A. **Parasitology Research**, v.86, p.194-199, 2000.
- WATANABE, K., NODA, K., HAMANO, S., KOGA, M., KISHIHARA, K., NOMOTO K., TADA, I. The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. **Parasitology Research**, v.86, p.188-93, 2000.
- ZAHA, O., HIRATA, T., KINJO, F., SAITO, A. Strongyloidiasis - Program in diagnosis and treatment. **Internal Medicine**, v.39, p.695-700, 2000.

FU-00013614-3