



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Rosângela Maria Rodrigues

516.995.132.2
R 696 n
T55/mem.

***“REATIVIDADE DE ANTICORPOS IGE ESPECÍFICOS A COMPONENTES
ANTIGÊNICOS DE *Strongyloides ratti* POR ELISA E IMMUNOBLOTTING NA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA”***

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

UBERLÂNDIA – MG
2002

SISBI/UFU



1000204845



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Rosângela Maria Rodrigues

***“REATIVIDADE DE ANTICORPOS IGE ESPECÍFICOS A COMPONENTES
ANTIGÊNICOS DE *Strongyloides ratti* POR ELISA E IMMUNOBLOTTING NA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA”***

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

**Profª Drª Julia Maria Costa Cruz
Orientadora**

Uberlândia – MG
2002



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**

Rosângela Maria Rodrigues

***“REATIVIDADE DE ANTICORPOS IGE ESPECÍFICOS A COMPONENTES
ANTIGÊNICOS DE *Strongyloides ratti* POR ELISA E IMMUNOBLOTTING NA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA”***

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

**Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz
Orientadora**

**Prof^o Dr^o Ernesto Akio Taketomi
Co-Orientador**

Uberlândia – MG
2002

Trabalho realizado nos laboratórios de Parasitologia e Imunologia da Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Cada um constrói, dia por dia, hora por hora, muitas vezes sem mesmo o saber, seu próprio futuro. A sorte que nos cabe na vida atual foi preparada pelas nossas ações anteriores; da mesma forma, edificamos no presente as condições da existência futura.”

Leon Dénis

Dedico

A Deus por me conceder a vitória em mais uma etapa da minha vida, e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

A minha mãe por estar presente em todos os momentos da minha vida me incentivando a seguir em frente, sem medo de enfrentar os possíveis obstáculos que poderão surgir.

Ao meu noivo João Batista por ter compartilhado comigo os momentos felizes e também os difíceis desta caminhada.

Agradecimentos

Aos meus irmãos, Roges, Roberta e Adriano, pelo companheirismo e por me apoiar em todos os momentos e aos meus demais irmãos.

À professora Dr^a Julia Maria Costa Cruz pela orientação, incentivo e também pelo carinho demonstrado durante todo esse período.

Ao professor Dr^o Ernesto Akio Taketomi, pela co-orientação e pelas sugestões de mudança do trabalho.

*À Professora Dr^a Dulcinéa Maria Barbosa Campos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pelo fornecimento larvas de *Strongyloides ratti*.*

À Professora Dr^a Márcia Cury, pelo carinho atenção e amizade durante todo esse período.

Ao professor Dr^o Wanderley Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Dr^a Janethe Deolina de Oliveira Pena do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, pela análise crítica do manuscrito e participação da banca examinadora.

Um agradecimento especial para: Deise Aparecida de Oliveira Silva pela paciência e apoio para realização desta pesquisa.

Ao Jair Júnior, pela amizade e cooperação, e por não se limitar em ajudar nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

À Mônica Camargo Sopelete, pelo auxílio na análise estatística e sugestões na apresentação e discussão dos resultados e também pela atenção e carinho durante todos os momentos que passamos juntas.

À Idessania Nazareth da Costa por todos os momentos que passamos juntas pelo companheirismo e pelas experiências compartilhadas pelas lições de vida aprendidas.

Às amigas Bárbara e Flavinha pelo incentivo, carinho e amizade durante esse período de convivência.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas (HC-UFU), setor de Parasitologia, pelo empenho na obtenção das amostras biológicas.

Aos funcionários da FAEPU e em especial ao Maurílio, Senhores Wilson e Jose por ter oferecido condições para obtenção dos dados.

À Danielle, Maria Cecília, Dayane pelo auxílio na colheita do sangue dos pacientes.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas-UFU, em especial a Maria do Rosário, Ivanildes Solange, Geraldo e Maria das Graças Marçal, pela amizade e apoio durante a realização desta pesquisa.

Ao secretário do curso de pós-graduação, João Martins Neto, pelos auxílios prestados e pela amizade.

Aos colegas do curso de pós graduação, Gleyce, Cristina, Geraldo, Adriano Gomes e Cláudio que me ajudaram em qualquer momento no desenvolvimento dessa pesquisa, e a todos que participaram direta ou indiretamente da mesma.

RESUMO

A estrogiloidíase é uma doença parasitária de importância em países tropicais e subtropicais. Embora seja uma infecção limitada ao trato gastro intestinal pode levar o paciente à morte em casos de hiperinfecção e doença disseminada. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de componentes antigênicos reconhecidos por anticorpos IgE específico, em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase utilizando como antígeno heterólogo o extrato salino de *Strongyloides ratti*, no *Immunoblotting* (IB) e comparando-o com ELISA. Larvas filarióides de *S. ratti* foram obtidas através da cultura de fezes de *Rattus rattus* infectados experimentalmente e recolhidas pelo método de Baermann-Moraes. Foram analisados um total de 126, sendo 50 amostras de soros de pacientes que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes (grupo I), 38 de pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e 38 de indivíduos copronegativos em três exames parasitológicos (grupo III). Os níveis de IgE específica a *Strongyloides* foram quantificados por ELISA indireto em todas amostras de soro e os componentes antigênicos foram detectados por IB em 50 amostras de soro do grupo I, 10 amostras do grupo II e 10 amostras do grupo III. Os níveis de IgE determinados em índice ELISA (IE) foram significativamente maiores nos pacientes do grupo I (132,2) do que nos grupos II (51,4) e III (80,7), demonstrando positividade de 54%, 0% e 10,5% respectivamente. Quinze componentes antigênicos (101, 81, 70, 63, 61, 57, 54, 44, 39, 36, 33, 28, 19, 15 e 7 kDa), foram reconhecidos por IB IgE anti-*Strongyloides* em 50 amostras de soro no grupo I, com frequência variando de 8 a 46%. No grupo II, somente duas bandas (101 e 81 kDa) foram detectadas com frequência de 10% e não foi demonstrada nenhuma reatividade no grupo III. A frequência da banda antigênica de 101 kDa no grupo I (46%) foi significativamente maior em relação às frequências do grupo II (10%) e III (0%). Não foi demonstrada diferença quando comparada com a frequência da banda antigênica de 81 kDa entre grupo I (36%) e grupo II (10%). Analisando os resultados obtidos por ELISA em relação a reatividade dos componentes antigênicos reconhecidos por IB – IgE para *Strongyloides* no grupo I soros com IE ≥ 500 reconheceram os 15 componentes como imunodominantes enquanto soros com IE entre 149 a 499 reconheceram 7 bandas imunodominantes (101, 81, 70, 63, 61, 44, e 7 kDa). Desta forma, sugere-se que esses componentes antigênicos reconhecidos por IgE anti-*Strongyloides* podem ser considerados como marcadores importantes para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.

SUMMARY

Strongyloidiasis is a worldwide parasitic disease of importance in tropical and subtropical countries. Although primarily restricted to the gastrointestinal tract, hyperinfection and disseminated disease can occur and cause death. This study aimed to evaluate the profile of *Strongyloides* antigenic components recognized by specific IgE antibodies in serum samples of patients with strongyloidiasis, by using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen in Immunoblotting (IB) and to compare it with ELISA. *S. ratti* filariform larvae were obtained from culture of feces of experimentally infected *Rattus rattus* and harvested by the Baermann-Moraes method. A total of 126 serum samples were analyzed, 50 serum samples of patients who were shedding *S. stercoralis* larvae in feces (group I), 38 sera of patients with other intestinal parasitoses (group II), and 38 sera of subjects with negative results in three parasitologic assays (group III, copronegative). Levels of specific IgE to *Strongyloides* were measured by indirect ELISA in all serum samples and the antigenic components were detected by IB in 50 serum samples of group I, 10 of group II, and 10 of group III. Levels of IgE expressed in ELISA index (EI) were significantly higher in patients of group I (132.2) than in group II (51.4) and group III (80.7), with positivity rates of 54%, 0% and 10.5%, respectively. Fifteen antigenic components were recognized antigenic (101, 81, 70, 63, 61, 57, 54, 44, 39, 36, 33, 28, 19, 15 e 7 kDa) by IgE anti-*Strongyloides* by IB in the group I, with frequency ranging from 8% to 46%. In contrast, in the group II, only 2 antigenic bands (101 and 81 kDa) were detected in a frequency of 10% and no reactivity was found in the group III. The frequency of the antigenic band of 101 kDa in the group I (46%) was significantly higher than in groups II (10%) and III (0%). No difference was found when comparing the frequency of the 81 kDa band in the group I (36%) and group II (10%). When analyzing the ELISA-IgE results in relation to reactivity of antigenic components by IB-IgE to *Strongyloides* in the group I, sera with EI ≥ 500 recognized 15 immunodominant components whereas sera with EI from 149 to 499 recognized 7 immunodominant bands (101, 81, 70, 63, 61, 44 and 7 kDa). Thus, it can be suggested that these immunodominant antigenic components recognized by IgE anti-*Strongyloides* might be considered as important markers for serodiagnosis of human strongyloidiasis.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Histórico e Classificação	1
1.2 - Aspectos Biológicos da Estrongiloidíase	2
1.3 - Epidemiologia	4
1.4 - Aspectos Clínicos da Estrongiloidíase	6
1.5 - Tratamento	8
1.6 - Diagnóstico	8
1.6.1 - Diagnóstico Parasitológico	9
1.6.2 - Diagnóstico Imunológico	11
1.7 - Antígeno Heterólogo	13
1.8 - O papel da Imunoglobulina E (IgE) na Estrongiloidíase Humana	15
2 – OBJETIVOS	18
3 - MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 - Caracterização dos Grupos de Estudo	19
3.2 - Antígeno Heterólogo de <i>Strongyloides ratti</i>	20
3.2.1 - Obtenção de Larvas	20
3.2.2 - Coprocultura pelo Método de Looss	20
3.2.3 - Método de Baermann-Moraes para Obtenção de Larvas	21
3.2.4 - Produção do Extrato Salino de <i>S. ratti</i>	22
3.3 - Diagnóstico Parasitológicos de Fezes	22
3.3.1 - Amostras Fecais	22
3.3.2 - Método de Baermann-Moraes	22
3.3.3 - Método de Hoffmann Pons & Janer (Hoffmann, Pons, Janer, 1934)	23
3.4 – Diagnóstico Imunológico	23
3.4.1 - Teste Imunoenzimático ELISA IgE específico	24
3.4.2 - Análise do Perfil Eletroforético do Extrato Antigênico de <i>S. ratti</i>	26
3.4.2.1 - SDS - PAGE em gel de poliacrilamida	26
3.4.2.2 – Coloração do Gel por Nitrato de Prata	27
3.4.2.3 – Eletroforese e <i>Immunoblotting</i>	28
3.5 - Análise Estatística	29
3.6 – Normas de Biossegurança	30
4 – RESULTADOS	31
4.1 – Caracterização dos Grupos Estudados Quanto a Sexo e Idade	31
4.2 – Obtenção de Larvas de <i>S. ratti</i>	32
4.3 – ELISA para IgE específico anti- <i>Strongyloides stercoralis</i>	32
4.4 – <i>Immunoblotting</i> -IgE específico	34
4.5 – Avaliação do índice ELISA com o Número de Componentes Antigênicos Reconhecidos por <i>Immunoblotting</i>	39
5 – DISCUSSÃO	43
6 – CONCLUSÕES	47
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8 - ANEXOS	59

1 - INTRODUÇÃO

Strongyloides stercoralis (BAVAY, 1876) é um nematódeo intestinal que infecta grande parte da população mundial, com predominância em regiões tropicais e sub tropicais, podendo ser encontrado esporadicamente em regiões temperadas. A strongiloidíase em indivíduos com infecção limitada ao trato gastro-intestinal geralmente é assintomática, pode ocorrer hiperinfecção e invasão sistêmica do parasito em seu estágio de larva em indivíduos com desnutrição protéico-calórica, neoplasias, transplante renal, lupus eritematoso sistêmico, presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tuberculose ou recebendo tratamento com drogas imunossupressoras, evoluindo para óbito (GOMPELS *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1999; NOZAIIS *et al.*, 2001; SIDDIQUI; BERK, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

1.1 – Histórico e Classificação

S. stercoralis foi identificado pela primeira vez em 1876, pelo médico francês Louis Normand na cidade de Toulon-França, ao examinar fezes diarreicas de soldados que tinham voltado da Cochinchina (atual Vietnã). As formas parasitárias foram descritas primeiramente por Bavay em 1876, como *Anguillula stercoralis* (latim *Anguillula* = pequena enguia ou peixe longo e *stercus* = esterco) para as encontradas na luz intestinal e como *Anguillula intestinalis* para as obtidas em necropsia. Em 1911, Leukart demonstrou serem as formas *stercoralis* e

intestinalis pertencentes a mesma espécie heterogenética, a fêmea partenogenética e a outra geração de vida livre, passando a denominá-la *Strongyloides stercoralis* (PÊSSOA; MARTINS, 1982; GROVE, 1996).

O nematódeo *Strongyloides* sp., pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, subclasse Rhabditia, ordem Rhabditida, família Strongyloididae. O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies das quais somente duas tem importância clínica para o homem *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. A primeira espécie tem distribuição mundial, especialmente nas regiões tropicais, podendo também infectar cães, gatos e macacos e a segunda, é encontrada na África e nas Filipinas. Uma subespécie, *S. f. kellyi* foi descrita recentemente parasitando crianças residentes na Papua Nova Guiné (PIRES; DREYER, 1993; REY, 2001).

1.2 - Aspectos Biológicos da Estrongiloidíase

As fêmeas partenogenéticas, em seu habitat normal, 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 a postura. Nas formas graves da estrongiloidíase podem ser encontradas desde a porção pilórica do estômago até o intestino grosso (COSTA-CRUZ, 2000).

Larvas rabditóides, eliminadas nas fezes de indivíduos parasitados, podem seguir o ciclo direto ou partenogenético e o ciclo 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, dando origem a três tipos de larvas rabditóides: larvas rabditóides triplóides ($3n$), que se transformam em larvas filarióides

infectantes, completando o ciclo direto; larvas rabditóides diplóides ($2n$), que originam fêmeas de vida livre; e larvas rabditóides haplóide ($1n$), que evoluem para machos de vida livre, sendo que estes dois últimos tipos de larvas completam o ciclo indireto (PIRES & DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000).

No ciclo direto, as larvas rabditóides no solo ou sobre a pele da região perineal, após 24 a 72 horas se transformam em larvas infectantes (L3). No ciclo indireto, as larvas rabditóides sofrem quatro mudas no solo e, após 18 a 24 horas, produzem fêmeas e machos de vida livre. Os ovos originados do acasalamento das formas adultas de vida livre serão triplóides, e as larvas rabditóides evoluem para larvas filarióides ($3n$) infectantes (COSTA CRUZ, 2000)

Os ciclos direto e indireto se completam pela penetração ativa das larvas L3 na pele ou mucosas oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro. Essas larvas secretam melanoproteases, que auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos, que ocorrem numa velocidade de 10 cm por hora. Algumas morrem no local, mas o ciclo continua através das larvas que atingem a circulação venosa linfática e através destes vasos seguem para o coração e os pulmões. Nos capilares pulmonares transformam-se em L4, atravessam a membrana alveolar e, através de migração pela árvore brônquica, chegam a faringe, podendo ser deglutidas. Atingindo o intestino delgado transformam-se em fêmeas partenogenéticas que depositam seus ovos na mucosa intestinal, sendo que as larvas, deles oriundas, alcançam a luz intestinal (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2000).

A contaminação do solo resulta do hábito de defecação no chão. Para que as larvas rabditóides sobrevivam no solo, desenvolvam-se até adultos machos e fêmeas de vida livre e se multipliquem, são necessárias algumas condições ambientais. O solo deve ser arenoso, poroso, rico em matéria orgânica, úmido, com ausência de luz direta. A temperatura ótima varia entre 25 a 30 °C, a evolução torna-se lenta entre 11 e 19 °C, e abaixo de 8 °C as larvas

rabditóides tornam-se in^{im}viáveis. O clima influencia sobre a prevalência da estrogiloidíase, sendo maior nas áreas tropicais e subtropicais e rara em regiões de clima temperado (REY, 2001).

A infecção no homem, ocorre na maioria das vezes, através da penetração ativa das larvas filarióides (L3), as quais não tem preferência por um ou outro ponto do tegumento, ou ocasionalmente, através das mucosas, principalmente da boca e do esôfago (hetero ou primoinfecção). A transmissão da estrogiloidíase pode ocorrer pelos mecanismos da auto-infecção externa ou exógena e auto-infecção interna ou endógena, sendo que no primeiro as larvas rabditóides presentes na região perineal, transformam-se em larvas filarióides infectantes que aí penetram, completando o ciclo direto. No mecanismo de auto-infecção ~~externa~~^{interna}, larvas rabditóides, ainda presentes na luz intestinal (íleo ou cólon) de indivíduos infectados, transformam-se em larvas filarióides. Através desse mecanismo a doença pode manter-se crônica por meses ou anos (FERREIRA *et al.*, 1991; COSTA-CRUZ, 2000; REY, 2001).

1.3– Epidemiologia

A estrogiloidíase é uma doença parasitária de distribuição mundial. Nas áreas endêmicas, a única fonte de infecção é o homem, mesmo que cães, gatos e outros animais possam infectar-se com *S. stercoralis*, o parasitismo é transitório (REY, 2001).

Esta helmintose tem distribuição mundial heterogênea, em áreas de predileção no Sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África e algumas ilhas do Caribe. Três regiões mundiais foram definidas de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). Na Europa a

infecção prevalece em agricultores, hortigranjeiros e trabalhadores rurais, e nos países tropicais, a doença atinge principalmente crianças pela freqüente permanência em solos contaminados (PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

Embora a estrogiloidíase tenha maior prevalência em áreas tropicais e subtropicais, a infecção pode ocorrer em residentes e migrantes de países desenvolvidos, em viajantes e veteranos (CELEDON *et al.*, 1994, ATKINS *et al.*, 1999).

Na América Latina há relatos sobre a ocorrência da estrogiloidíase, como na Argentina onde Taranto, Fillippi, Orione (1993) demonstraram prevalência de 83,3% para esta helmintose.

No Brasil, a importância deste parasito como agente etiológico da estrogiloidíase ou anguilulose, foi salientada primeiramente por Ribeiro da Luz em 1880. A partir de então, estudos têm sido realizados demonstrando variações na prevalência dessa parasitose em decorrência de vários fatores, principalmente como idade, diferenças geográficas e sócio econômicas sendo que os estados de maior ocorrência da estrogiloidíase são Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (GENTA, 1989; COSTA-CRUZ; KOBAYASHI *et al.*, 1996; COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998; PAULA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Machado; Costa-Cruz (1998) demonstraram que a cidade de Uberlândia-MG, é uma região hiperendêmica para a estrogiloidíase, pois através dos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN 1917; MORAES 1948) e Lutz (LUTZ, 1919), obtiveram 13% de ocorrência para *S. stercoralis* em crianças de 4 meses a 07 anos usuárias de creches.

1.4 - Aspectos Clínicos da Estrongiloidíase

A maioria dos portadores de *S. stercoralis* são assintomáticos ou oligossintomáticos, o que não significa ausência de ação patogênica e de lesões. Formas graves da parasitose, às vezes fatais, geralmente associam-se à ocorrência de fatores predisponentes extrínsecos principalmente carga parasitária adquirida, e de fatores intrínsecos como enterite decorrente da subalimentação por deficiência protéica e ocorrência de diarreia e vômitos. Esses fatores, facilitariam os mecanismos de auto-infecção, associações com outras infecções parasitárias e mesmo bacterianas comprometendo assim a resposta imunitária natural ou adquirida (COSTA-CRUZ, 2000).

As lesões observadas na estrongiloidíase são decorrentes da penetração do parasito no hospedeiro, de sua migração durante o ciclo pulmonar, de sua permanência e multiplicação na mucosa intestinal, ou em localizações ectópicas. Quando ocorre a penetração de um pequeno número de larvas no organismo, as manifestações cutâneas geralmente não são percebidas, porém quando o grau de infecção é alto, os sintomas são variados como eritema, prurido, edema local, lesões urticariformes, erupção da pele, placas eritemato-pruriginosas e são raras, mas podem ocorrer hemorragias petequiais (REY, 2001).

As larvas filarióides podem assumir um trajeto errante permanecendo no tronco, nádegas, períneo, virilha e coxas (*larva currens*), essas larvas podem avançar de 5 a 15 cm por hora. O quadro clínico é caracterizado por dermatite perineal por lesões únicas ou múltiplas, em forma de pápulas eritematosas pruriginosas de aspecto linear ou serpiginosas (PIRES; DREYER, 1993).

Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estão presente em todos os indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou sem expectoração, febre, dispnéia,

crises asmátiformes decorrentes das larvas filarióides e ocasionalmente de fêmeas, que aí podem atingir a maturidade liberando larvas rabditóides. A migração e a muda das larvas podem provocar rompimento dos capilares dos alvéolos causando hemorragias e infiltrado inflamatório, constituído de linfócitos e eosinófilos e podem ser limitados ou em casos mais graves, provocar a Síndrome de Löffler, edema pulmonar e insuficiência respiratória (FERREIRA, 1991; PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000; TING, 2000).

A presença da fêmea partenogenética, ovos e larvas no intestino delgado ou ocasionalmente no intestino grosso produzem lesões que levam a enterite catarral, hemorragia, diarreia leve, anorexia, náuseas, vômitos, pequenas úlceras, intestino congesto com grande secreção de mucosa, aumento das células secretoras de mucina. Nos quadros caracterizados por enterite edematosa, os parasitos são visualizados em todas as túnicas da parede intestinal onde ocorre uma reação inflamatória com desaparecimento do relevo mucoso, caracterizando a síndrome da má absorção, quadro de certa gravidade porém de caráter reversível (FERREIRA, 1991; PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000).

Nos sintomas mais graves, onde a carga parasitária é maior, a enterite é ulcerativa, resultando assim em inflamação com eosinofilia intensa e ulcerações com invasão bacteriana, que, durante a evolução, serão substituídas por tecido fibrótico, levando a rigidez da mucosa intestinal. Observa-se ainda diarreia persistente, náuseas e vômitos, síndromes disentéricas com esteatorreia, seguida de desidratação que pode levar ao choque hipovolêmico, se associado a vômitos, emagrecimento e acentuado comprometimento do estado geral do doente, muitas vezes fatal (HUGGINS *et al.*, 1989; COSTA-CRUZ, 2000; REY, 2001).

As manifestações extra intestinais, podem levar a quadros graves, potencialmente fatais em indivíduos imunodeprimidos seja por desnutrição, corticoideterapia, agentes citostáticos, raios X, leucemias, linfomas, insuficiência renal crônica, neoplasias, lupus eritematoso

sistêmico, SIDA ou presença do HIV (DEVAUTT-JR *et al.*, 1990; PIRES; DREYER, 1993; ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; FERREIRA *et al.*, 1999; TING, 2000).

1.5 – Tratamento

O tiabendazol e albendazol são drogas de escolha para o tratamento da estrogiloidíase desde 1960, mas apresentam vários efeitos colaterais e são pouco eficazes para controle da endemia. A ivermectina droga inicialmente de uso na medicina veterinária, tem sido bastante efetiva e segura no controle de doenças endêmicas como a estrogiloidíase humana (LESSNAU; CAN; TALAVERA, 1993; LINDO *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 1999; CHIODINI *et al.*, 2000; ZAHA *et al.*, 2000; HUGGINS, *et al.*, 2001).

1.6 – Diagnóstico

A triagem clássica de pacientes com provável estrogiloidíase ocorre quando os mesmos apresentam diarreia, dor abdominal e urticária, além desse quadro pode apresentar eosinofilia sangüínea ou um perfil radiológico sugestivo (GROVE, 1996).

Dentre os exames de rotina, o hemograma permite a visualização das variações hematológicas que ocorrem nas doenças parasitárias, como anemia e eosinofilia. Os eosinófilos compreendem 2 a 4% dos leucócitos em indivíduos não alérgicos, observa-se um aumento na taxa de eosinófilos de até 82% na fase aguda da doença, no entanto diminui na fase crônica 8 a 15%, desaparecendo nos casos de evolução grave ou fatal (HUGGINS, *et al.*, 1989; FERREIRA, 1991).

Em pacientes com estrongiloidíase severa, o exame da secreção do lavado brônquico ou biópsia da pele pode ser o método diagnóstico mais provável, porém na maioria das vezes o diagnóstico é realizado *post-mortem* (LEUNG; LIEW; SUNG, 1997). Desta forma, a mortalidade ainda continua alta, mesmo que o diagnóstico seja realizado precocemente (GORDON *et al.*, 1994). Há relatos de estrongiloidíase severa confirmada por métodos não usuais de diagnóstico, como biópsia do sistema digestivo, exame do fluido alveolar, análise da secreção respiratória por microscopia fluorescente, sangue periférico e fluido cerebrospinal (GENTA; MILES; FIELDS, 1989; ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; NEWTON *et al.*, 1992; TAKAYANAGUI *et al.*, 1995; NOMURA; REKRUT, 1996).

1.6.1 - Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico da estrongiloidíase é confirmado pelo encontro das formas parasitárias de *S. stercoralis*. Os parasitos são usualmente visualizados nas fezes, podendo serem vistos no fluido duodenal e ocasionalmente, em outros tecidos ou fluídos de pessoas infectadas (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991).

A identificação torna-se mais acurada quando os parasitos adultos, assim como os estádios larvais são avaliados pelo exame morfológico direto, sendo isto raramente possível com espécimes clínicos, uma vez que o parasito é encontrado em número muito pequeno na maioria das pessoas e a liberação de larvas nas fezes muitas vezes é mínima e irregular. Em infecção moderada, por exemplo, existe a probabilidade de não mais que 25 larvas/g de fezes, sendo que assim o diagnóstico parasitológico de rotina para *S. stercoralis* torna-se pouco sensível (NAGESWARAN; GRAIG; DEVANEY, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; GROVE, 1996; ZAHA *et al.*, 2000; SIDDIQUI; BERK, 2001).

5 Várias técnicas têm sido utilizadas para demonstrar as formas lavárias nas fezes, incluindo o esfregaço direto em solução salina, método de concentração formol-éter (Ritchie), método de Baermann-Moraes, cultura em papel de filtro, Harada-Mori e cultura em placa de ágar (BAERMANN, 1917; WILLCOX; COURA, 1991; TAKAYANAGUI *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1996).

As técnicas de cultura dos helmintos são baseadas no desenvolvimento do seu ciclo indireto, onde são produzidos um elevado número de larvas, facilitando o diagnóstico. Assim, o método de Harada-Mori utiliza fezes espalhadas em tira de papel de filtro, para cultivo em um 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 que utilizam placas de Petri com agar líquido ou sólido (LIU; WELLER, 1993). Um método modificado da cultura em agar sólido, no qual a superfície do agar é lavada com formalina para extração das larvas antes da centrifugação para exame microscópico, é considerado mais sensível quando comparado às outras técnicas de cultivo, sendo por isso recomendado para pesquisas epidemiológicas e clínicas sobre a estrogiloidíase (KOGA *et al.*, 1991; SALAZAR; GUTIERREZ; BERK, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1996; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MARAKOTE, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Os métodos de rotina, ou seja, o esfregaço fecal direto e o método de concentração formol-éter possuem baixa sensibilidade para o diagnóstico da estrogiloidíase humana, mesmo quando são examinadas várias amostras em diferentes períodos, porém o método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) apresenta uma maior sensibilidade. Este método, assim com o Rugai, que nada mais é que uma simplificação deste, baseia-se no hidro e termotropismo positivos das larvas, bastando três ou cinco amostras de fezes para detectar a maioria dos indivíduos infectados (ANDRADE NETO, ASSEF, 1996).

Esses métodos caracterizam-se pela simplicidade e rapidez de execução (uma ou duas horas), (REY, 2001). No entanto, como o método de Baermann – Moraes, requer mobilidade das larvas viáveis, necessitando de material fecal sem conservante, não tem sido freqüentemente utilizado na rotina laboratorial, onde utiliza-se como método parasitológico a sedimentação espontânea ou Lutz (LUTZ, 1919), Blagg ou MIFIC (LIU; WELLER, 1993).

Apesar dos métodos de cultivo terem se mostrado bastantes sensíveis em laboratórios de pesquisa há dúvida sobre a praticidade do seu uso rotineiro devido à sua complexidade, custo, demora na obtenção dos resultados e risco de infecção pela manipulação de larvas infectantes (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996). Além disso, algumas cepas de *S. stercoralis* não conseguem evoluir *in vitro* para a forma adulta estercoral, tornando impraticável o uso rotineiro de técnicas de cultura para o diagnóstico da estrogiloidíase (SANTOS; PADILHA; FILHO, 1996).

1.6.2 – Diagnóstico Imunológico

Testes imunológicos têm sido úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro, nos casos de formas assintomáticas com a finalidade de esclarecimento do diagnóstico clínico, e em inquéritos soropidemiológicos por apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (COSTA-CRUZ, 2000).

A primeira abordagem do imunodiagnóstico na estrogiloidíase foi o teste cutâneo realizado com extratos de larvas filarióides por Fuelleborn em 1926, que surgiu da observação clínica de reações cutâneas (*larva currens*) e urticária não específica da doença sugerindo a existência de resposta alérgica (hipersensibilidade) à larva filarióide que migra pela pele (PIRES; DREYER, 1993).

A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sido utilizada por vários pesquisadores, com diversidade em relação aos antígenos de larvas filarióides utilizados, na execução de técnica em lâminas, em tubos ou na detecção de diferentes classes de imunoglobulinas (GROVE; BLAIR, 1981; ROSSI *et al.*, 1993; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2001).

O teste imunodiagnóstico mais utilizado na pesquisa da strongiloidíase é o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), pois é um teste econômico no que se refere ao uso de reagentes, sensível na detecção de anticorpos específicos e que permite que várias amostras sejam testadas em um período de tempo relativamente curto (ROITT; BRASTOFF; MALE, 1999). O teste ELISA tem sido descrito, utilizando-se extratos antigênicos para a detecção de diferentes classes de imunoglobulinas nos soros de indivíduos infectados por *S. stercoralis* (GENTA; DOUCE; WALZER, 1986; GENTA, 1988; CONWAY *et al.*, 1993a; LINDO *et al.*, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; SCHAFFEL *et al.*, 2001).

Uma das principais dificuldades encontradas na utilização do imunodiagnóstico é a possibilidade de haver reações cruzadas com outras parasitoses, principalmente esquistossomose, filariose e, dependendo da técnica, com ancilostomídeos. Este problema pode ser solucionado pela caracterização das frações protéicas específicas de *Strongyloides* através de técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e seu emprego como antígeno purificado ou análise das amostras de soros pela técnica de *Western blotting*, para identificação das frações proteicas imunodominantes (CONWAY *et al.*, 1993b; ATKINS *et al.*, 1999; COSTA-CRUZ, 2000; SIDDIQUI; BERK, 2001).

A técnica *Western blotting* ou *Immunoblotting* tem sido aplicada no imunodiagnóstico da strongiloidíase, havendo indicativo de ser uma técnica altamente sensível e específica no

reconhecimento de frações protéicas da larva filarióide de *S. stercoralis* (SATO *et al.*, 1990; ATKINS *et al.*, 1999; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MARAKOTE, 1999).

A maior limitação encontrada na padronização dos testes sorológicos mais específicos é a dificuldade de obter-se larvas filarióides de *S. stercoralis*. Devido a esta dificuldade tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos provenientes de *Strongyloides ratti*, *S. venezuelensis* ou *S. cebus* (COSTA-CRUZ *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2001).

1.7 – Antígeno Heterólogo

Os modelos experimentais de *S. ratti* e *S. venezuelensis* têm sido utilizados em várias linhas de pesquisas, tais como, no estudo da biologia molecular, interação parasita-hospedeiro, ensaios terapêuticos e fontes de antígenos heterólogos para padronização de novas técnicas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (ABE; SUGAYA; YOSHIMURA, 1998; OVINGTON *et al.*, 1998; RAMACHANDRAN *et al.*, 1998; COSTA-CRUZ, 2000; SIDDIQUI; STANLEY; BERK, 2000).

S. ratti (SANDGROUND, 1925) é um parasito de rato e camundongos. Ele infecta com maior facilidade o rato branco que é mantido em laboratório. A cultura de fezes infectadas permite obtenção de um grande número de larvas filarióides, simplificando assim a obtenção do antígeno (ROSSI *et al.*, 1993; COSTA- CRUZ, 2000).

O ciclo de vida de *S. ratti* apresenta geração de vida livre e fêmea parasitária. A forma parasitária consiste unicamente de fêmeas parasitárias adultas as quais encontram-se embebidas na mucosa do intestino delgado de ratos. Os ovos produzidos por essas fêmeas são eliminados juntamente com as fezes para o meio ambiente. O ciclo de vida pode ocorrer sob

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

As larvas de *S. ratti* de estágio inicial apresentam um desenvolvimento seletivo. Embora seja um parasito obrigatório, uma parte significativa do ciclo ocorre fora do hospedeiro, demonstrando assim que o estágio de vida livre pode ser facilmente desenvolvido e manipulados em fezes de animais infectados (VINEY, 1999; PATERSON; FISHER; VINEY, 2000; SIDDIQUI; BERK, 2001).

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

A composição antigênica de *S. ratti* foi comparada com a de *S. stercoralis*, demonstrando-se que esta espécie pode ser utilizada como antígeno heterólogo para o diagnóstico em soro substituindo o antígeno de *S. stercoralis*, como fonte segura de antígeno para o diagnóstico em laboratório (GROVE; BLAIR, 1981; NAGESWARAN; CRAIG; DEVANEY, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA 1995).

1.8 - O papel da Imunoglobulina E (IgE) na Estrongiloidíase Humana

A IgE embora presente em pequena quantidade no soro, em concentração inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$, é encontrada nas membranas de superfície de mastócitos e basófilos em todos os indivíduos, e através da porção $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ (receptor de alta afinidade para porção Fc de IgE) sensibiliza as células alvos da pele e superfícies das mucosas intestinal, conjuntival, nasal e brônquica. Em condições patológicas como nas infecções helmínticas e na atopia, este nível pode aumentar para concentração superior a 1.000 $\mu\text{g/mL}$, provocando assim aumento na reatividade alérgica (LYNCH *et al.*, 1993; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Infecções por helmintos induzem a produção de citocinas T *helper* (Th2), as quais contribuem para o mecanismo de expulsão dos vermes e respostas inflamatórias que podem proteger ou danificar o hospedeiro. Dentre essas citocinas, a interleucina-4 (IL-4) é considerada importante no processo de inflamação, imunidade protetora e estimulação da produção de anticorpos da classe E (FINKELMAN *et al.*, 1999; SOUZA- ATTA *et al.*, 1999, NEGRÃO- CORRÊA, 2001).

A elevação dos títulos de IgE é um sinal característico importante da resposta imune contra infecções causadas por helmintos e, nestes casos, ocorre independentemente de qualquer estado alérgico do indivíduo infectado (FINKELMAN; PEARCE; URBAN-JR, 1991; LYNCH *et al.*, 1992; LYNCH *et al.*, 1993). O aumento nos níveis séricos de IgE pode ser também observado em animais com infecções helmínticas, que são utilizados como modelos experimentais em laboratórios (KORENAGA; NAVA; TADA, 1986).

Níveis elevados de IgE específico anti-*S. stercoralis* foram detectados em 101 pacientes com estrongiloidíase confirmada, através do método de *Radioallergosorbent test*-RAST, demonstrando positividade de 89,5% (McRURY *et al.*, 1986).

Estudo realizado em 28 pacientes de uma área endêmica na Jamaica, demonstrou que a produção elevada de IgG4 em combinação com a baixa de IgE, pode estabelecer a infecção e gerar a estrongiloidíase crônica assintomática (ATKINS *et al.*, 1997).

Vários estudos demonstraram que a presença de IgG4 no soro de pacientes com estrongiloidíase crônica atua como fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por IgE. Através destes estudos a IgG4 ficou conhecida como anticorpo bloqueador, havendo indícios que ela pode modular as reações alérgicas mediadas pela IgE, através da competição ou inibição de sua ligação às células, principalmente mastócitos. Os elevados níveis de IgE são demonstrados em pacientes imunocompetentes com estrongiloidíase, mas, na doença disseminada e nos casos de imunodepressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade (ATKINS *et al.*, 1997; VERCELLI *et al.*, 1998; ATKINS *et al.*, 1999).

Em áreas endêmicas para a infecção com HTLV-1 (vírus da infecção linfotrópica de células T humanas), que está associado com a leucemia/linfoma de células T adultas, como ocorre em Okinawa, Japão, há associação entre esta infecção e a estrongiloidíase (HAYASHI *et al.*, 1997). Há relatos de que em indivíduos co-infectados com *S. stercoralis* e HTVL-1 pode ocorrer um balanço imunológico a favor do parasito, onde os efeitos da resposta imune sobre este parece ser controlado primeiramente por IgE e eosinófilos (NEWTON *et al.*, 1992). Conseqüentemente, a imunidade humoral por IgE, ou mediada por células, predispõe os indivíduos infectados com HTLV-1 a infecções mais severas por *S. stercoralis* (GROVE, 1996; ADEDAYO; GRELL; BELLOT, 2001).

Os níveis de IgE correlacionam-se inversamente com os de interferon gama (IFN- γ) em indivíduos infectados com HTVL-1. O IFN- γ , produzido por alguns indivíduos infectados pelo HTVL-1, regula a produção da IL-4, conseqüentemente, reduz os níveis de IgE, dificultando assim o tratamento da estrogiloidíase e contribuindo para maior severidade da doença (NEVA *et al.*, 1998; PORTO *et al.*, 2001).

Pouco se sabe sobre a resposta imune mediada pelo anticorpo IgE durante a infecção por *S. ratti*, em ratos ou camundongos. Mas, tem sido relatado que cada estágio do parasito induz uma resposta imune específica mediada pela imunoglobulina IgE (KORENAGA; NAVA; TADA, 1986).

Como a relação entre estrogiloidíase e os níveis de IgE específica, ainda não são conclusivas e, considerando-se que o índice dessa parasitose em Uberlândia, demonstrado por Machado; Costa-Cruz, (1998), foi de 13%, procurou-se avaliar neste estudo o reconhecimento pelo anticorpo IgE específico anti-*S. stercoralis* das frações antigênicas, através de *Immunoblotting*, utilizando-se antígeno heterólogo de *S. ratti* em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase e as variações deste reconhecimento antigênico de acordo com diferentes níveis de IgE específicos detectados por ELISA.

2 – OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de componentes antigênicos reconhecidos por anticorpos IgE específicos por *Immunoblotting*, utilizando como antígeno heterólogo o extrato salino de *S. ratti*, em amostras de soros de pacientes com strongiloidíase e controles.

- Comparar a variação deste perfil de acordo com os níveis de IgE específicos determinados por ELISA.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Caracterização dos Grupos de Estudo

Um total de 126 amostras de soros de pacientes de diferentes faixas etárias atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, MG e nos Centros de Saúde do município de Uberlândia foi analisado. Os indivíduos foram subdivididos em três grupos de acordo com o perfil parasitológico obtido em exame de fezes através das técnicas parasitológicas de Baermann & Moraes (BAERMANN 1917; MORAES 1948), Mertiolato Iodo Conservante – MIFC (BLAGG *et al.*, 1955) e Lutz (1919): Grupo I constituiu de 50 amostras de soros de pacientes que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes copropositivos (Anexo 1); Grupo II consistiu de 38 amostras de soros de pacientes com outras parasitoses intestinais: *Ascaris lumbricoides* (10 casos), *Enterobius vermicularis* (4 casos), *Ancylostoma* sp (5 casos), *Taenia* sp (3 casos), *Trichuris trichiura* (2 casos), *Giardia lamblia* (12 casos) e *Entamoeba histolytica* (2 casos) (Anexo 2) e Grupo III consistiu de 38 amostras de soros de indivíduos com três exames parasitológicos de fezes negativos (copronegativos) (Anexo 3). Os grupos II e III eram sorologicamente negativos no teste ELISA para detecção de anticorpo IgG específico anti-*Strongyloides*, nos quais utilizou-se como antígeno o extrato salino de *S. ratti*.

Todas as amostras de soros dos pacientes foram analisadas por ELISA, para o *Immunoblotting* foram utilizadas 70 amostras de soros, sendo 50 amostras do grupo I, 10 amostras de soro do grupo II e 10 do grupo III.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 – Antígeno Heterólogo de *Strongyloides ratti*

3.2.1 - Obtenção de larvas

Larvas filarioídes de *S. ratti* foram obtidas de fezes de ratos da espécie *Rattus rattus*, pesando entre 100 e 150 g, mantidos experimentalmente infectados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás.

O inóculo de 1 mL da suspensão de 2.000 larvas/rato foi feito por via cutânea. Após 10 dias de inoculação estes animais foram colocados em gaiolas metálicas, forradas com papel umedecido em água, permanecendo por uma noite para defecação. Posteriormente, foi realizada a colheita das fezes para proceder o cultivo pelo método de Looss. Após um período de cinco dias, as larvas foram obtidas pelo método de Baermann-Moraes (item 3.2.3). A contagem de larvas foi realizada utilizando-se 10 µL deste concentrado colocado em três lâminas distintas, em seguida foi feito uma média entre as três lâminas para verificar-se a quantidade de larvas existentes em 1 mL.

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

3.2.2 – Coprocultura pelo Método de Looss

A coprocultura foi realizada utilizando o método de Looss (NEVES *et al.*, 2000) onde misturam-se partes iguais de material fecal e carvão vegetal triturados em grãos pequenos

ligeiramente umedecidos e colocados, de modo a formar uma camada fina, em placas de Petri. As placas com o material a ser cultivado permaneceram em repouso por 5 dias, à temperatura de 25°C em estufa incubadora BOD (FANEM, São Paulo). Após este procedimento, as larvas filarióides foram recolhidas pelo método de BAERMANN, (1917) e MORAES, (1948).

3.2.3 – Método de Baermann – Moraes para Obtenção de Larvas

O método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), foi empregado com objetivo de obtenção das larvas presentes no material fecal cultivado pelo método de Looss e no diagnóstico parasitológico de fezes nos pacientes e indivíduos saudáveis analisados. Em um suporte de madeira foram colocados funis de vidro com diâmetro de 11,5 cm, em cuja haste foi colocada mangueira de borracha de 10 cm. no qual foi introduzido um tubo de ensaio de 10 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, e colocado uma pinça para obliteração da passagem de água para o tubo.

Cada funil foi preenchido até a borda com água à temperatura de 45°C, e sobre o mesmo colocou-se uma tela metálica (100 malhas por cm²) e sobre esta uma gaze dobrada em quatro. Em seguida, depositou-se sobre a mesma, aproximadamente, 10 g de fezes sem conservante que em contato com a água aquecida, permaneceu em repouso por uma hora. Posteriormente, foi retirado um tubo de ensaio com cerca de 5 a 7 mL de solução contendo água. Procedeu-se a centrifugação desta solução em tubo de ensaio a 1.000 x g por 15 minutos e cinco procedimentos de lavagem das larvas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 0,15M pH 7,2 durante três minutos. Após a última lavagem, o sedimento contendo as larvas foi ressuspendido e distribuído em alíquota e conservado a -20°C até o momento do uso.

3.2.4 – Produção do Extrato Salino de *S. ratti*

Larvas filarióides de *S. ratti* foram descongeladas e ressuspensas em 1 mL de PBS a 0,15M, pH 7,2, contendo 2mM de EGTA, 2mM de EDTA e 0,3 mg/ mL do inibidor de proteases Complete (Boehringer Mannheim, Alemanha). Para extração antigênica, as larvas foram rompidas com auxílio de homogeneizador de tecidos (OMNITH International, EUA) por 5 ciclos de 5 minutos em banho de gelo e posteriormente, submetidas a 8 ciclos de 20 segundos de tratamento por ultra-som a 40 kHz (Thorton, Inspec Eletrônica, São Paulo). Em seguida, o material foi incubado por 18 horas a 4 °C sob agitação lenta e centrifugado a 3.000 x g, por 30 minutos a 4 °C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY *et. al.*, 1951) e o extrato antigênico obtido foi analisado em SDS- PAGE e utilizado para realização dos testes ELISA e *Immunoblotting*.

3.3 –Diagnóstico Parasitológico de Fezes

3.3.1 – Amostras Fecais

Foram colhidas três amostras fecais de cada indivíduo, em frascos plásticos sem conservantes e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia para realização dos diagnósticos parasitológicos

3.3.2 – Método de Baermann-Moraes

Método descrito de acordo com item 3.2.3 para detecção de larvas de *S. stercoralis*.

3.3.3 - Método de Hoffmann, Pons e Janer (1934)

Esse método foi utilizado para detecção de ovos, cistos ou larvas de enteroparasitos. Aproximadamente 2 g de fezes de cada amostra foram colocados em um *becker* com cerca de 5 mL de água e triturados por meio de um bastão de vidro. Em seguida acrescentou-se 20 mL de água e filtrou-se a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 mL de capacidade, utilizando-se uma tela de náilon com cerca de 80 a 100 malhas por cm² coberta com gaze cirúrgica dobrada em quatro.

Os resíduos contidos na gaze foram lavados com aproximadamente 20 mL de água, o líquido da lavagem foi recolhido no mesmo cálice e completado para 200 mL. Esta suspensão de fezes permaneceu em repouso durante 24 horas. Findo esse tempo, uma gota do sedimento e de lugol foram depositadas numa lâmina de microscopia. Após homogeneização, o material foi coberto por lamínula (24 x 24 mm) e examinado em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão), no aumento de 100 e 400 X. Das três amostras colhidas de cada indivíduo foram preparadas três lâminas, sendo estas analisadas por três examinadores diferentes.

3.4 – Diagnóstico Imunológico

As amostras de sangue dos pacientes e indivíduos saudáveis foram colhidas no período de março de 2001 a novembro de 2001, por punção venosa, em tubo sem anticoagulante (VACUTAINER®–*Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer Systems*, Franklin Lakes, NJ, EUA), e encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia da UFU, para obtenção dos soros

após centrifugação (FANEN, São Paulo) a 350 x g por 10 minutos. Posteriormente foram armazenadas em alíquotas de 500 µL a - 20 °C até o momento do uso.

3.4.1 - Teste Imunoenzimático ELISA-IgE Específico

Anticorpos IgE específicos anti-*Strongyloides* foram detectados nas amostras de soros dos pacientes dos grupos I, II e III por ELISA indireto utilizando extrato antigênico heterólogo segundo técnica descrita por Costa-Cruz *et al.*, (1999).

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Costar; Sigma) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de extrato salino de *S. ratti* em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (*Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate* – Sigma) (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T adicionada de soroalbumina bovina (BSA, Sigma) a 1% (PBS-T-BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Subseqüentemente, as placas foram submetidas a seis ciclos de lavagens, e as amostras de soros na diluição 1:2 em PBS-T-BSA, em duplicata foram adicionadas (50µL/poço) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente.

Após novas lavagens como descrito anteriormente foi adicionado o anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Baltimore, MD, EUA) na diluição ideal de 1:500 (50µL/poço) e incubado por 1 hora a 37 °C. Após novos processos de lavagens, adicionou-se o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) a 1:500 (50 µL/poço) e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após última lavagem, adicionou-se o substrato enzimático que consistiu-se da solução de 2'2 – *azinobis-3-ethyl-benzathiazoline sulfonic acid* (ABTS – Sigma) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2, contendo H₂O₂ a 0,03%. Os valores de Densidade Óptica (DO)

foram determinados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA), a 405 nm, em tempos variáveis. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação. Soros positivos foram obtidos de pacientes que eliminavam larvas de *S. stercoralis* nas fezes, e negativos de indivíduos saudáveis (copronegativos para *Strongyloides*)

Os resultados foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), segundo fórmula: $IE = (DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}) \times 100$, sendo o *cut off* calculado para cada placa, pela média das DO obtidas de 3 soros controles negativos acrescidas de 5 desvios padrões. Foram considerados positivos os pacientes que apresentaram $IE \geq 100$.

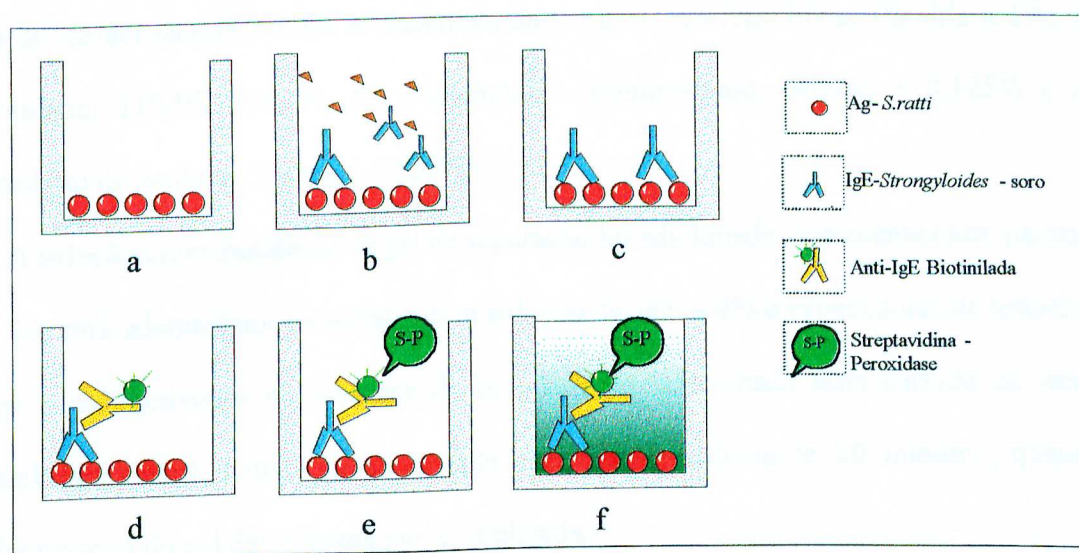


Figura 1 – Esquema do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação dos níveis de IgE específica a *Strongyloides*. (a): Antígeno de *S. ratti*; (b): adição da amostra de soro; (c): após a lavagem, permanece a IgE específica ligada ao antígeno; (d) adição do conjugado anti-IgE marcado com peroxidase; (e): adição de Streptavidina-Peroxidase; (f): adição do substrato enzimático ($H_2O_2 + ABTS$).

3.4.2 –Análise do Perfil Eletroforético do Extrato Antigênico de *S. ratt*

3.4.2.1 – SDS – PAGE em Gel de Poliacrilamida

Para caracterizar o perfil eletroforético do extrato salino de *S. ratt* foi empregada a técnica de eletroforese vertical (Sistema Biorad, EUA) em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) a 14% em condições desnaturantes e não redutoras segundo Laemmeli (1970).

Para o gel de separação foi utilizado: Tris – HCl (Sigma) a 0,375% pH 8,8; SDS (Dodecil Sulfato de Sódio, EUA) a 0,1%; EDTA (Ácido-etileno-diamino-tetra-acético, Merck) a 2mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida (n, n' – metileno-bis-acrilamida a 1%; água bidestilada; TEMED (N, N, N, N-tetrametil- aminometano, Sigma) a 0,125% e APS (Persulfato de Amônio, Sigma) a 0,125%.

A solução correspondente ao gel de separação foi adicionada lentamente entre placas (10 cm X 8 cm), adequadamente seladas com solução de agar a 4% e espaçadores de teflon. Para evitar a polimerização na presença de oxigênio, foi adicionada uma camada de butanol (Merck, Germany) a qual foi descartada após aproximadamente 20 minutos, quando a polimerização do gel de separação foi completada.

Em seguida, procedeu-se à preparação do gel de empilhamento que consistiu de: Tris – HCl a 0,375% pH 6,8; SDS a 0,1%; EDTA a 2mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida a 1%; água bidestilada; TEMED a 0,125% e APS a 0,125%. O gel de empilhamento foi adicionado sobre o gel de separação e moldado por teflon para formação de poços de aplicação das amostras.

Após polimerização completa do gel de empilhamento foi aplicado 5µL da amostra antigênica diluída na proporção de 1:1 em tampão de amostra (sacarose 20%, SDS 2%, EGTA

11 mM, azul de Bromofenol 0,25% e Tris 31 mM), e incubado por 3 minutos a 100 °C. Foram aplicados também padrões de peso molecular de 6,5 a 205 kDa (Sigma).

As placas de vidro foram encaixadas em cubas para eletroforese contendo tampão Tris – glicina a 0,025M pH 8,3 e a migração das proteínas realizada em corrente de 25 mA por aproximadamente 4 horas.

3.4.2.2 – Coloração do Gel por Nitrato de Prata

A coloração do gel por nitrato de prata (AgNO_3) foi realizada segundo método “Color” prata de Friedman (1982), no qual os polipeptídios se destacam em tons amarelo ferrugem.

Após a migração das proteínas o gel foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora que era constituída de metanol a 50% (Merck), ácido acético a 12% (Indústria Farmacêutica Rio Química–São Paulo, Brasil), formaldeído a 0,05% (Quimibrás Indústrias Química S.A., Rio de Janeiro, Brasil), e água bidestilada, por uma hora ou por aproximadamente 20 horas. Em seguida, removeu-se o fixador com etanol a 50% em três banhos de 20 minutos cada. Posteriormente foi efetuado um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio penta hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 0,2% por um minuto. Em seguida, o gel foi lavado três vezes de 20 segundos cada, com água bidestilada, e impregnado, com solução de formaldeído a 37% adicionado de água e nitrato de prata (AgNO_3) a 2%, ao abrigo da luz por 20 minutos. O gel foi lavado em água bidestilada por 3 vezes de 20 segundos, e revelado com solução composta de 3 g de Na_2CO_3 , 25 μL de formaldeído e 1 mL de tiosulfato de sódio penta hidratado a 0,2% (Merck) até o aparecimento da cor. A reação foi interrompida com solução de metanol a 50% e ácido acético glacial a 12% e o gel depositado entre folhas de papel celofane para secar.

3.4.2.3 – Eletroforese e *Immunoblotting*

A técnica *immunoblotting* foi utilizada para caracterizar o perfil de proteínas do extrato salino de *S. ratti*, reconhecidos pelo anticorpo IgE anti - *Strongyloides* presente nas amostras de soro dos grupos I, II e III. Assim a amostra do extrato antigênico (260 µg/poço) preparadas como no item 3.4.2.1 foram submetidas a SDS – PAGE a 14% (LAEMMLI, 1970), juntamente com padrões de alto e baixo peso molecular.

Após a separação eletroforética, os componentes protéicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (0,45 µm - Sigma), utilizando sistema de transferência semi-úmido (*Multiphor II Electrophoresis Unit* – Pharmacia LKB, Suécia) de acordo com Towbin, Staehelin, Gordon. (1979). Foi preparado um *sandwich* com três folhas de papel de filtro (Munktell, Grau 1F, Pharmacia LKB), membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas e mais três folhas de papel de filtro; todos umedecidos em tampão de transferência constituído de Tris 25 mM, glicina 192 mM (Sigma) e metanol a 20%, foram colocados em uma cuba de transferência para aplicação de uma corrente de 0,8 mA por cm², totalizando 144 mA, durante duas horas. Membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm de largura e bloqueadas por 6 horas à temperatura ambiente com salina tamponada com Tris contendo Tween 20 0,05% (TBS-T) adicionada de leite desnatado (Molico Nestlé, São Paulo) a 5%, e em seguida, as tiras foram incubadas por 24 horas a 4 °C com amostra de soro diluído a 1:2 em TBS-T adicionado de leite molico desnatado a 1% (TBS-TM) sob agitação constante. Posteriormente as tiras foram submetidas a 6 ciclos de lavagens por um período de 5 minutos cada em TBS-T e incubadas durante 20 horas aproximadamente a 4 °C, com anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (Kirkegaard & Perry Laboratories) na diluição de 1: 250 em TBS-TM. Após novas lavagens,

foi adicionado o sistema de amplificação ABC (Complexo streptavidina biotina-peroxidase; Dako, Dinamarca) na diluição de 1:500 em TBS-TM e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as tiras foram lavadas novamente como descrito anteriormente em TBS-T e a revelação foi realizada utilizando-se sistema de quimioluminescência conforme procedimento descrito pelo fabricante ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra).

3.5 - Análise Estatística

Análises entre médias geométricas nos grupos estudados foram feitas pelo teste *t* de *Student* utilizando o *software* GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPade Software, Inc).

Os pesos moleculares aparentes das bandas antigênicas de *S. ratti* foram estimados por regressão linear, a partir de cálculos da mobilidade relativa (RF), segundo fórmula:

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

As frequências das bandas antigênicas reconhecidas pelas amostras de soros dos pacientes do grupo I e II e III, foram analisadas pelo teste diferença entre duas proporções, utilizando o programa (*Stastistic for Windows – Release 4.5 A- Statesoft, Inc. 1993*). A hipótese nula foi rejeitada quando valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.6- Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita e manuseio do material e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de descritas por Chaves-Borges; Mineo (1997).

4 - RESULTADOS

4.1 – Caracterização dos Grupos Estudados Quanto a Sexo e Idade

A distribuição por sexo dos pacientes com *estrongiloidíase* (grupo I), outras parasitoses intestinais (grupo II) e indivíduos saudáveis (grupo III) está demonstrada na Tabela 1. Um total de 126 amostras de soro foi analisada, das quais 61 (48,41%) pertenciam a indivíduos do sexo masculino e 65 (51,59%) do sexo feminino. A idade dos indivíduos analisados variou de 2 a 75 anos de idade no grupo I (n = 50), de 4 a 62 anos no grupo II (n = 38) e de 2 a 62 anos no grupo III (n = 38).

Tabela 1 - Distribuição por sexo dos 50 pacientes com *estrongiloidíase* (grupo I), 38 pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e 38 indivíduos copronegativos (grupo III)

SEXO	TOTAL n (%)	GRUPOS		
		I n (%)	II n (%)	III n (%)
MASCULINO	61 (48,4%)	26 (52%)	19 (50%)	16 (42,1%)
FEMININO	65 (51,6%)	24 (48%)	19 (50%)	22 (57,9%)
TOTAL	126 (100%)	50 (100%)	38 (100%)	38 (100%)

4.2 – Obtenção de Larvas de *S. ratti*

Foram obtidas 500.000 larvas filarióides de *S. ratti*, após a cultura de fezes de *R. rattus*, infectados experimentalmente. Para obtenção do extrato salino de *S. ratti*, foram utilizadas 500.000 larvas filarióides. A concentração protéica obtida foi de 950 µg/mL, e volume de 6 mL.

4.3 - ELISA para IgE Específico anti- *S. stercoralis*

Os níveis de IgE específica a *Strongyloides*, expressos em Índice ELISA (IE) quantificados em amostras de soros de pacientes e de indivíduos saudáveis estão demonstrados na Figura 2. A média geométrica do grupo I (132,2) foi estatisticamente maior que as médias nos grupos II (51,4; $p < 0,0001$) e grupo III (80,7; $p = 0,0002$). A taxa de positividade foi de 54% (27/50) no grupo I, 0% (0/38) no grupo II e 10,5% (4/38) no grupo III (Figura 3)

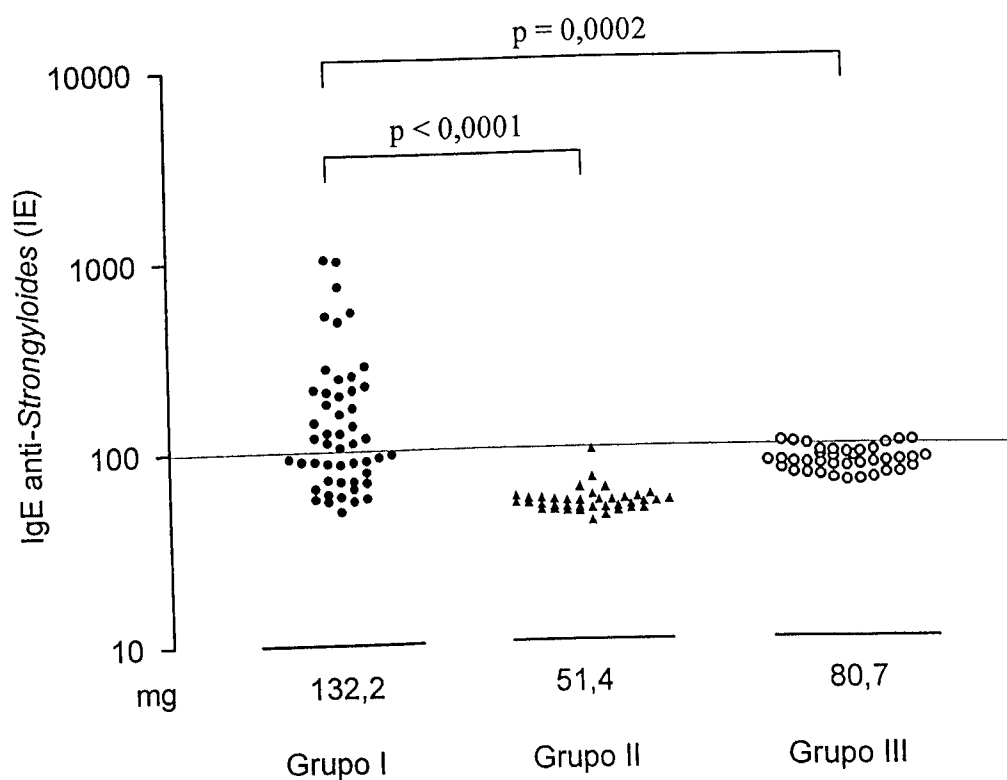


Figura 2. Níveis de IgE específica a *Strongyloides*, expressos em índice ELISA (IE) utilizando extrato antigênico heterólogo de *S. ratti* em 50 amostras de soro de pacientes do grupo I (copropositivos), 38 pacientes grupo II (outras parasitoses intestinais) e 38 indivíduos do grupo III (copronegativos). A linha tracejada indica o limiar de positividade ($IE \geq 100$); mg = média geométrica.

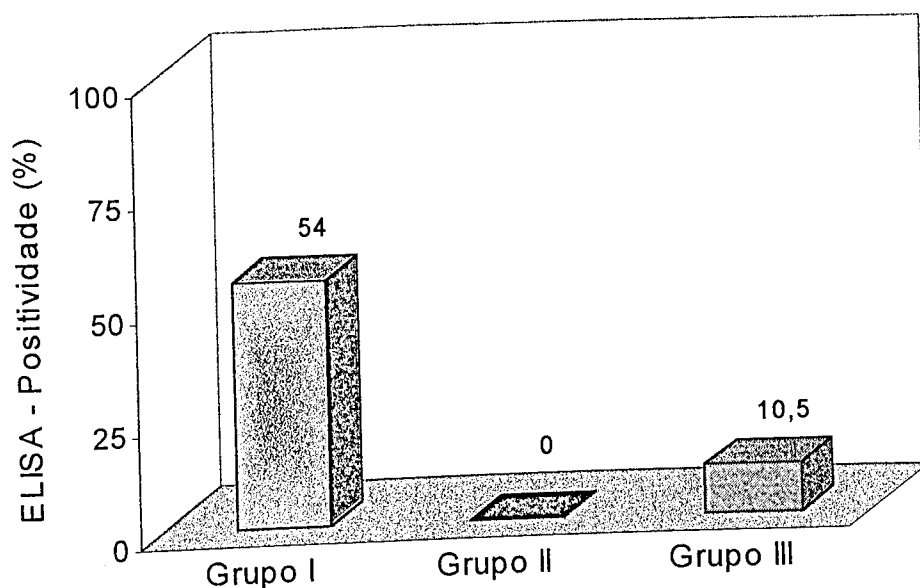


Figura 3. Positividade (%) do teste ELISA na detecção de IgE específica a *Strongyloides* em amostras de soro de 50 pacientes com estrongiloidíase (grupo I), 38 pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e 38 indivíduos copronegativos (grupo III)

4.4 – Immunoblotting IgE específico

O perfil eletroforético (SDS-PAGE) e a reatividade de anticorpos IgE a componentes antigênicos de *S. ratti* por *Immunoblotting* no soro dos pacientes do grupo I (n = 50), II (n = 10 os pacientes numerados a seguir conforme anexo 2) e III (n = 10 os indivíduos numerados segundo anexo 3). A figura 4 ilustra a reatividade de anticorpos IgE em 03 amostras de soros representativas de 03 pacientes do grupo I, 03 pacientes do grupo II e 3 indivíduos do grupo III. Os componentes antigênicos, com pesos moleculares variando entre 7 a 101 kDa, foram visualizados predominantemente no grupo I.

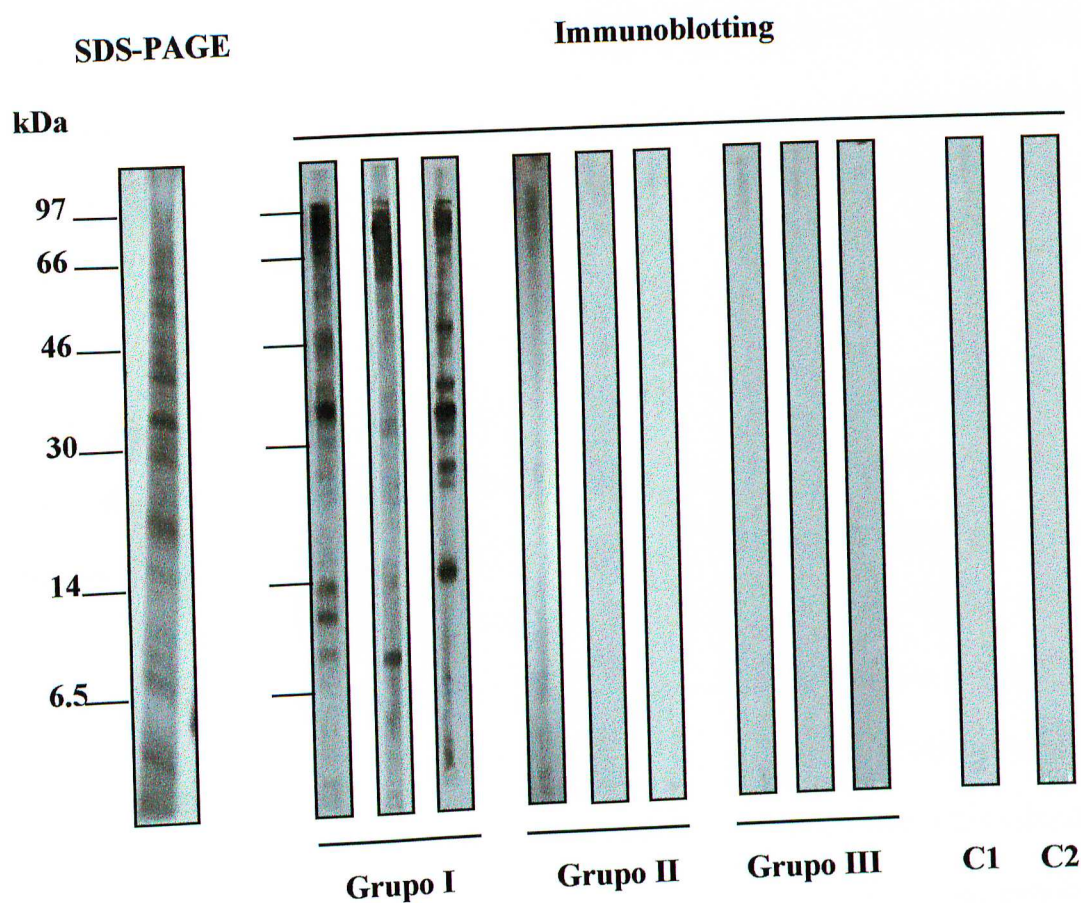


Figura 4. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) e reatividade de anticorpos IgE a componentes antigênicos de *S. ratti* (Immunoblotting) em 03 amostras de soros representativas de pacientes com estrogiloidíase (grupo I), 03 de pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e 03 de indivíduos do grupo III (copronegativos). C1 e C2 representam os controles da reação, na ausência de anticorpos primário e primário + secundário, respectivamente. Os padrões de peso molecular (kDa) estão indicados à esquerda.

Quinze bandas antigênicas (101, 81, 70, 63, 61, 57, 54, 44, 39, 36, 33, 28, 19, 15 e 7 kDa), foram reconhecidas por *Immunoblotting*-IgE em amostras de soros do grupo I, com frequência variando de 8 a 46%. Somente 2 bandas antigênicas (101 e 81 kDa) foram detectadas com frequência de 10% no grupo II e não foi demonstrado nenhuma reatividade no grupo III (Figura 5).

As frequências das bandas antigênicas do extrato salino de *S. ratti* foram analisadas comparativamente pelo teste de diferença entre duas proporções para todos os três grupos, no entanto somente as bandas antigênicas de 101 (46%) e 81 (36%) kDa no grupo I apresentaram frequência estatisticamente significativa quando comparadas aos grupos II e III. A banda antigênica de 101 kDa apresentou diferença estatisticamente significativa em relação às frequências do grupo II (10%) e III (0%), porém não apresentou diferença estatística significativa quando comparada à banda antigênica de 81 kDa. O componente antigênico de 81 kDa apresentou frequência estatisticamente significativa quando comparado aos grupos II e III ($p < 0,05$).

Os componentes antigênicos reconhecidos pela IgE anti - *Strongyloides* das amostras de soro dos pacientes do grupo I e II estão demonstrados na Tabela 2.

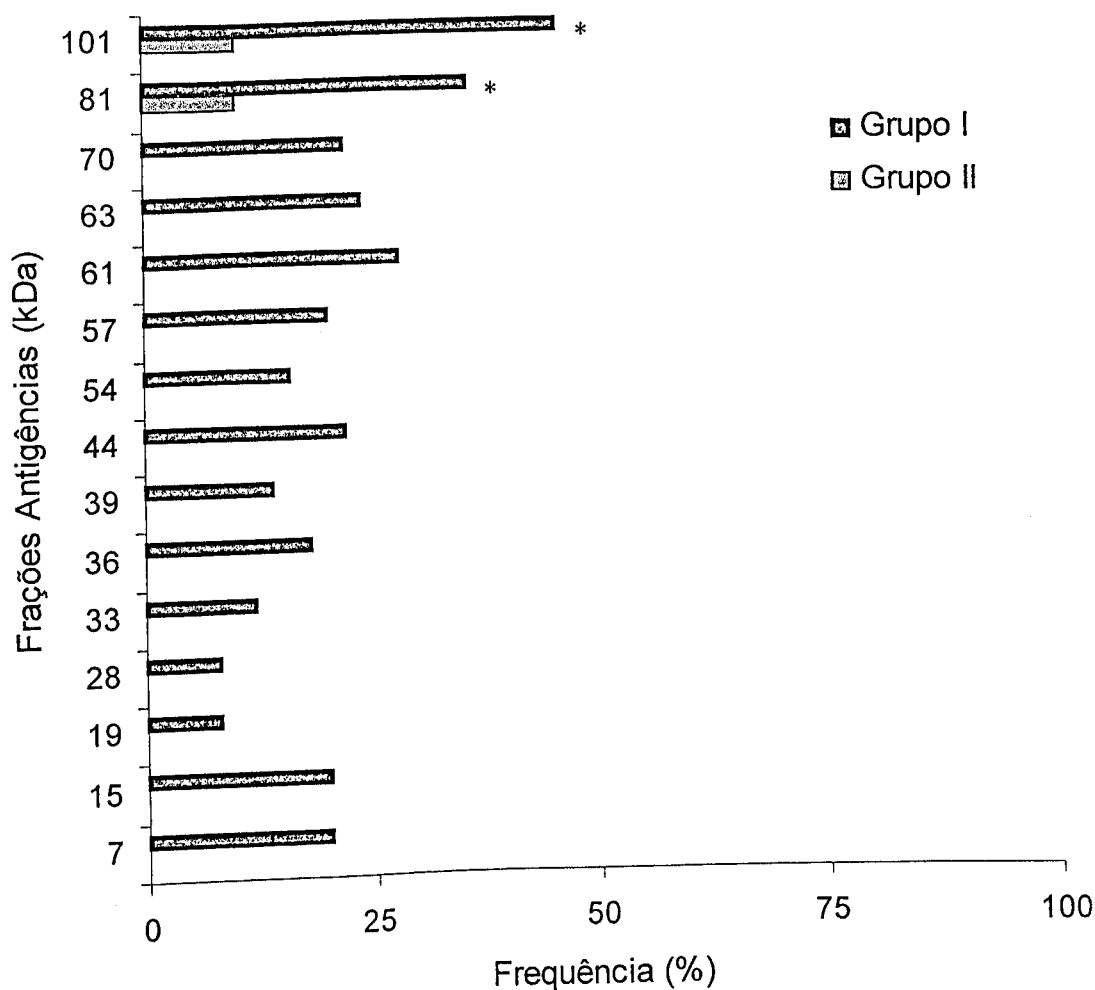


Figura 5. Frequência (%) de componentes antigênicos (kDa) de *S. ratti* reconhecidos por *Immunoblotting*-IgE, em amostras de soro de 50 pacientes do grupo I (copropositivos), 10 pacientes do grupo II (outras parasitoses intestinais) e 10 indivíduos do grupo III (copronegativos). * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2. - Frequência de 15 bandas antigênicas do extrato salino de *S. ratti* reconhecidas por *Immunoblotting* -IgE em amostras de soro de 50 pacientes com estrogiloidíase (grupo I) e 10 pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II)

BANDAS ANTIGÊNICAS (kDa)	FREQUÊNCIA n (%)	IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS
GRUPO I		
101	23 (46)	4, 5, 11, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 24, 27, 29, 32, 35, 36, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50
81	18 (36)	4, 5, 13, 14, 15, 17, 20, 24, 27, 29, 32, 35, 36, 44, 43, 45, 47, 49
70	11 (22)	15, 17, 20, 24, 27, 29, 32, 35, 44, 45, 49
63	12 (24)	4, 13, 15, 17, 24, 27, 29, 32, 35, 36, 44, 45
61	14 (28)	4, 5, 13, 14, 15, 17, 20, 24, 29, 32, 44, 45, 47, 49
57	10 (20)	4, 5, 14, 17, 20, 24, 36, 44, 45, 49
54	08 (16)	4, 15, 17, 24, 27, 36, 44, 45
44	11 (22)	4, 15, 17, 27, 29, 32, 35, 36, 44, 45, 47
39	07 (14)	4, 17, 20, 27, 35, 44, 45
36	09 (18)	4, 15, 17, 24, 27, 32, 35, 36, 45
33	06 (12)	17, 24, 27, 32, 35, 45
28	04 (8)	15, 17, 27, 45
19	04 (8)	14, 17, 20, 45
15	10 (20)	13, 14, 17, 23, 27, 32, 35, 44, 45, 47
07	11 (22)	4, 13, 14, 15, 17, 24, 29, 35, 44, 45, 49
GRUPO II		
101	01 (10)	14
81	01 (10)	14

4.5 – Avaliação do Índice ELISA com Número de Componentes Antigênicos

Reconhecidos por *Immunoblotting*

Analisando os resultados obtidos por ELISA para detecção de IgE específica a *Strongyloides* em relação ao número de componentes antigênicos reconhecidos por *Immunoblotting*-IgE em 50 pacientes do grupo I, 10 pacientes do grupo II e em 10 indivíduos do grupo III, os valores de Índice ELISA foram arbitrariamente subdivididos em quatro classes de reatividade: (1) < 100 ; (2) 100 a 149; (3) 150 a 499 e (4) ≥ 500 IE (Tabela 3). No grupo I, dos soros que foram negativos para IgE específica ($IE < 100$), apenas 2/23 (8,7%) reconheceram uma única banda (101 kDa); dos soros entre 100 a 149 IE, apenas 1/09 (11,1%) reconheceu uma única banda (101 kDa) e 2/09 (22,2%) reconheceram de 2 a 5 bandas; dos pacientes com IE entre 150 a 499, 8/13 (61,5%) reconheceram de 6 a 9 bandas e dos soros com níveis de IgE ≥ 500 IE, todos reconheceram mais de 6 bandas antigênicas. No grupo II, dos soros negativos para IgE ($IE < 100$), 9/10 (90%) não reconheceram bandas e somente 1/10 (10%) reconheceu duas bandas (101 e 81 kDa), sendo que estas apresentaram uma baixa intensidade quando comparada às mesmas bandas visualizadas no grupo I. No grupo III não foi observada qualquer reatividade antigênica nos 6 soros negativos para IgE, como também nos 4 soros com IgE entre 100 e 149 IE.

Tabela 3. Análise do número de componentes antigênicos reconhecidos por *Immunoblotting*-IgE em relação às diferentes classes de reatividade (<100, 100 a 149, 150 a 499 e ≥ 500 IE) obtidos por ELISA-IgE para *Strongyloides* em soros de pacientes do grupo I (n = 50), grupo II (n = 10) e grupo III (n = 10)

ELISA-IGE		IMMUNOBLOTTING-IGE				
CLASSES DE REATIVIDADE (IE)	NÚMERO DE AMOSTRAS	NÚMERO DE COMPONENTES ANTIGÊNICOS				
		0 n (%)	1 n (%)	2-5 n (%)	6-9 n (%)	≥ 10 n (%)
GRUPO I						
< 100	23	21 (91,3)	2 (8,7)	0	0	0
100 a 149	9	6 (66,7)	1 (11,1)	2 (22,2)	0	0
150 a 499	13	0	1 (7,7)	2 (15,4)	8 (61,5)	2 (15,4)
≥ 500	5	0	0	0	1 (20,0)	4 (80,0)
GRUPO II						
< 100	10	9 (90,0)	0	1 (10,0)	0	0
100 a 149	0	0	0	0	0	0
150 a 499	0	0	0	0	0	0
≥ 500	0	0	0	0	0	0
GRUPO III						
< 100	6	6 (100,0)	0	0	0	0
100 a 149	4	4 (100,0)	0	0	0	0
150 a 499	0	0	0	0	0	0
≥ 500	0	0	0	0	0	0

Considerando-se como imunodominantes as bandas antigênicas com frequência $\geq 50\%$, foram identificados 15 componentes antigênicos imunodominantes (101, 81, 70, 63, 61, 57, 54, 44, 39, 36, 33, 28, 19, 15 e 7 kDa) reconhecidos por soros do grupo I com níveis de IgE ≥ 500 IE, e 7 componentes imunodominantes (101, 81, 70, 63, 61, 44 e 7 kDa) nos soros com IE entre 150 a 499. Entre os soros IgE negativos ($IE < 100$) ou com IE entre 100 a 149, não foram identificados componentes antigênicos imunodominantes por *Immunoblotting* (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação de diferentes níveis de anticorpos IgE-*Strongyloides* (negativo, positivo fraco, positivo moderado e positivo forte) determinados por ELISA (IE) de acordo com as frequências de 15 componentes antigênicos reconhecidas por *Immunoblotting*-IgE presentes no soro de 50 indivíduos do grupo I.

FRAÇÕES ANTIGÊNICAS (kDa)	NÍVEIS DE ANTICORPOS IGE- <i>STRONGYLOIDES</i> (IE)			
	< 100 NEGATIVO N = 23	100 a 149 POSITIVO FRACO N = 09	150 a 499 POSITIVO MODERADO N = 13	≥ 500 POSITIVO FORTE N = 5
101	2 (8,7)	3 (33,3)	13 (100,0)	4 (80,0)
81	0	1 (11,1)	12 (92,3)	5 (100,0)
70	0	0	7 (53,8)	4 (80,0)
63	0	0	8 (61,5)	4 (80,0)
61	0	1 (11,1)	9 (69,2)	4 (80,0)
57	0	0	6 (46,1)	4 (80,0)
54	0	0	4 (30,8)	4 (80,0)
44	0	1 (11,1)	7 (53,8)	3 (60,0)
39	0	0	4 (30,8)	3 (60,0)
36	0	0	5 (38,5)	4 (80,0)
33	0	0	3 (23,1)	4 (80,0)
28	0	0	1 (7,7)	3 (60,0)
19	0	0	1 (7,7)	3 (60,0)
15	0	2 (22,2)	4 (30,8)	4 (80,0)
7	0	0	7 (53,8)	4 (80,0)

5 – DISCUSSÃO

A utilização dos testes sorológicos, têm demonstrado que estes podem ser utilizados em conjunto com os exames de fezes no diagnóstico da estrogiloidíase, ou ainda como uma técnica de monitoramento em pacientes submetidos a transplantes tanto antes quanto pós-cirurgia, bem como outras circunstâncias que levam a uma queda da resposta imune do hospedeiro. Os testes sorológicos são úteis principalmente, quando a pesquisa coprológica revela-se negativa na presença de uma sintomatologia sugestiva, visto que na maioria das vezes em infecção crônica o número de larvas é bastante reduzido e às vezes ausentes nas fezes.

Diante da dificuldade de se obter quantidades suficientes de larvas filarióides de *S. stercoralis*, tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos, provenientes de *S. ratti*, espécie que pode ser utilizada como fonte segura de antígenos para o sorodiagnóstico substituindo o antígeno de *S. stercoralis* (GROVE, BLAIR, 1981; ROSSI *et al.* 1993; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

O teste ELISA tem sido descrito na literatura, utilizando-se extratos antigênicos na detecção de diferentes classes de imunoglobulinas nos soros de indivíduos com estrogiloidíase. Embora seja um teste altamente sensível, o ELISA para detecção de IgG anti-*Strongyloides* pode reagir cruzadamente com outras parasitoses principalmente a esquistossomose, filariose e em alguns casos, com ancilostomídeos. Por outro lado, a detecção de IgE anti-*Strongyloides* por ELISA tem demonstrado ser altamente específica (LINDO *et al.*, 1994; GROVE, 1996; COSTA – CRUZ *et al.*, 1999).

Neste trabalho demonstrou-se que pacientes com estrogiloidíase (grupo I) apresentaram níveis significativamente aumentados de IgE específica anti-*Strongyloides*, e alto índice de

positividade quando comparado aos pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e com os indivíduos copronegativos (grupo III) (Figuras 2 e 3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Costa-Cruz *et al.* (1999), que utilizando extrato salino de *S. ratti* através do teste ELISA, encontraram uma positividade de 55% em 40 pacientes positivos para *S. stercoralis*, 2,5% em 40 pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e 0% em 40 indivíduos copronegativos (grupo III) e detectaram diferença estatística significativa entre o grupo copropositivo e os grupos II e III.

A disposição e o perfil eletroforético dependem de uma série de fatores. Um desses fatores consiste na concentração da acrilamida utilizada na preparação do gel que orienta o intervalo de migração das proteínas (GERSHONI, 1988). Para a concentração de 14% do SDS - PAGE, o perfil eletroforético encontrado neste estudo, com a utilização do extrato antigênico de *S. ratti*, revelou um complexo modelo de frações protéicas (Figura 4).

Immunblotting combina a resolução minuciosa da eletroforese em gel de poliacrilamida com alta sensibilidade de detectar pequenas quantidades de anticorpos através do ensaio imunoenzimático. É uma técnica que tem sido largamente utilizada para a caracterização de frações protéicas específicas de *Strongyloides* reativas a diferentes classes de imunoglobulinas (LARRALDE *et al.*, 1989; SATO *et al.* 1990; CONWAY *et al.*, 1993a; UPARANUKRAW, PHONGSRI; MARAKOTE, 1999).

Das quinze bandas antigênicas reconhecidas por soros de pacientes com estrongiloidíase, somente três (33, 36 e 44 kDa) já haviam sido descritas na literatura (ATKINS *et al.*, 1999). Levando em consideração os diferentes tipos de antígenos e a variabilidade intrínseca das reações pode-se inferir que as bandas antigênicas de 28 e 57 kDa, relatadas nesse estudo corresponderiam às de 29 e 56 kDa respectivamente, descritas por Atkins *et al.* (1999) utilizando antígeno homólogo de *S. stercoralis* na detecção de IgE específica. Embora as

bandas antigênicas de 101 e 81 kDa, não terem sido descritas na literatura observou-se diferença estatística significativa quando comparadas nos três grupos. Deve ressaltar-se que neste estudo a revelação consistiu-se de um método altamente sensível a quimiluminescência, o que possibilitou o reconhecimento destas bandas (Figura 5).

Avaliando-se as diferentes classes de reatividade determinadas por ELISA IgE anti-*Strongyloides* (Tabela 3) observou-se diferenças quanto à reatividade antigênica por *Immunoblotting*. Desta forma, nos pacientes do grupo I com níveis de IgE variando de 150 a 499 IE e níveis superiores a 500 IE, observou-se um maior número de diferentes bandas antigênicas reconhecidas por *Immunoblotting*. Esses resultados sugerem que esses indivíduos podem se encontrar em uma fase inicial de infecção por *S. stercoralis* (HAGAN, 1993; ATKINS *et al.*, 1997). Entretanto, os baixos níveis de IgE combinados à baixa frequência das bandas antigênicas detectadas por *Immunoblotting* sugerem que pode ter sido estabelecido nestes pacientes uma infecção crônica assintomática. Vários estudos têm demonstrado que em infecções crônicas por *S. stercoralis*, anticorpos IgG4 são predominantes, e desempenham um papel importante como modulador da resposta de defesa mediada por IgE (ISHIZAKA, 1982; ATKINS *et al.*, 1997; NEVA *et al.*, 1998; PORTO *et al.*, 2001).

No grupo II foi possível visualização dos componentes antigênicos de 101 e 81 kDa em somente 1 paciente que estava parasitado pelo *Enterobius vermicularis*, no entanto, quando comparados com os visualizados nos pacientes do grupo I, observou-se que estas apresentavam fraca marcação. Assim, como esse paciente apresentava índice ELISA menor que 100, a hipótese de reatividade cruzada com outras parasitoses intestinais não deve ser descartada.

Quanto à frequência das bandas antigênicas reconhecidas por soros de pacientes do grupo I (copropositivos) de acordo com diferentes classes de reatividade de ELISA IgE anti-

Strongyloides, houve um amplo espectro de reatividade frente ao extrato antigênico, considerando-se como imunodominantes as bandas de, 101, 81, 70, 63, 61, 57, 54, 44, 39, 36, 33, 28, 19, 15 e, 7 kDa, para os pacientes com índice ELISA maior ou igual a 500. Estes resultados não foram observados nos pacientes com IE entre 150 a 499, onde houve reconhecimento somente de 7 componentes imunodominantes (101, 81, 70, 63, 61, e 44 e 7 kDa). Destas bandas antigênicas imunodominantes reconhecidas por *Immunoblotting*, 7 (101, 81, 70, 63, 61, 44 e 7 kDa), estavam presentes em praticamente todas amostras dos soros dos pacientes copropositivos, sugerindo que esses componentes antigênicos podem ser fortes candidatos a potenciais antígenos para o sorodiagnóstico da estrogiloidíase (Tabela 4).

Segundo Atkins *et al.* (1999) os componentes antigênicos de 33, 36 e 44 kDa são considerados imunodominantes para antígenos de *S. stercoralis* reconhecidos por anticorpos IgE. Embora tenha sido utilizado neste trabalho antígeno heterólogo de *S. ratti* foi possível o reconhecimento dessas bandas com uma alta frequência, sugerindo a possibilidade de se utilizar o extrato salino de *S. ratti* como fonte de antígeno para testes imunológicos. Entretanto, estudos complementares com extrato homólogo de *S. stercoralis* complementariam a análise da importância das bandas aqui consideradas imunodominantes (101, 81, 70, 63, 61, 54 e 7 kDa) Diante desses resultados, sugere-se que o *Immunoblotting*-IgE em combinação com outros testes sorológicos poderá auxiliar na confirmação do diagnóstico da estrogiloidíase humana.

6 - CONCLUSÕES

O extrato salino de *S. ratti* apresentou resultados satisfatórios na detecção de anticorpos IgE específica, em ambos os testes ELISA e *Immunoblotting* no diagnóstico da estrongiloidíase humana.

Sugere-se que os componentes antigênicos reconhecidos neste estudo por anticorpos IgE anti-*Strongyloides* podem ser considerados como marcadores importantes para o imunodiagnóstico da estrongiloidíase.

Immunoblotting-IgE em combinação com o teste ELISA poderá ser considerado uma ferramenta importante para diagnosticar a estrongiloidíase humana, contribuindo assim para esclarecer os casos em que a doença é crônica assintomática.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H. A.; POBER, S. J. **Imunologia Celular & Molecular**, 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000, p. 305-307.
- ABE, T.; SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. Analysis of T cell populations and IL-3 mRNA expression in mesenteric lymph node cells and intestinal intraepithelial lymphocytes in *Strongyloides ratti* infected mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 1-2, 1998.
- ADEDAYO, A. O.; GRELL, G. A.; BELLOT, P. Case study: Fatal strongyloidiasis associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 650-651, 2001.
- ANDRADE NETO, J. L. de; ASSEF, M. C. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 1373-1378.
- 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. A. P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21 p. 517-526, 1999.
- BAERMANN, G. Eine infache methode zur auffindung von Anckylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. Mededeel. Mit. H. Geneesk. Batavia: **Laboratories Weltrevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillulla intestinalis*) nouveau ver nímatoide trove par le Dr. Normand chez les nalades atteints de diarrhea de Cochinchine. **Compose Rend. Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.
- BLAGG, W.; SCHOLOEGEL, E. L.; MANSOUR, N. S.; KHALAF, G. I. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 4, p. 23 -28, 1955.

* Segundo normas da ABNT (NBR-6023/ 2000)

- BOLLA, R. I.; ROBERTS, L. S. Gametogenesis and chromosomal complement in *Strongyloides ratti* (Nematoda: Rabdiasoidea). **Journal of Parasitology**, v. 54, p. 849 – 855, 1968.
- 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 reviews of the literature. **Medicine**, v. 73, p. 256-263, 1994.
- CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratório**. Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55p.
- CHIODINI, P. L.; REID A. J.; WIAWLK, M. J.; FIRMIN, R.; FOWERAKER, J. Parenteral ivermectin in *Strongyloides* hyperinfection. **The 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 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.
- COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10. ed., Belo Horizonte: Atheneu, 2000, p. 247-258,.
- COSTA CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected on filter paper in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329-331, 1998.
- COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome cuts 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.; 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 soros na estrogiloidíase humana. IN: **Congresso Brasileiro de Parasitologia, 16.**, Poços de Caldas: **Resumos**. Belo Horizonte, 1. ed., 1999, p. 127.

DEVAULT, JR. G. A.; KING, J. W.; ROHR, M. S.; LANDRENEAU, M.D.; BROWN, S.T.; McDONALD, J. C. Opportunistic infection with *Strongyloides stercoralis* in renal transplantation. **Revista Infectious Diseases**, v. 12, p. 653 -671, 1990.

FERREIRA, M. S. Estrogiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCCACIA, 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 of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.

FINKELMAN, F. D.; PEARCE, E. J.; URBAN-JR, F. J. Regulation a biological function of helminth induce cytokine responses. **Parasitology Today**, v. 7, p. 62-65, 1991.

FINKELMAN, F. D.; WYNN, A. T.; DONALDSON, D. D.; URBAN-JR, F. J. The role of IL-13 in helminth induce inflammation and protective immunity against nematode infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 420-426, 1999.

FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline poliacrilamid gels. **Annals of Biochemistry**, v. 126, p. 346-349, 1982.

GENTA, R. M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **American Journal Clinical Pathology**, v.89, p.391-394, 1988.

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of Infectious Diseases** v. 11, p. 755-767, 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 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.

GERSHONI, J. M. Protein blotting: a manual. **Methods of Biochemistry Analysis**, v. 33, p.1-58, 1988.

GOMPELS, M. M.; TADOL, J.; PETERS, B. S.; PINCHING, A. J. Disseminated strongyloidiasis in AIDS: uncommon but important. **AIDS**, v. 5 p. 329-332, 1991.

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 ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.

HAGAN, P. IgE and protective immunity to helminth infections. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 1-4, 1993.

HAYASHI, J.; KISHIHARA, Y.; YOSHIMURA, E.; FURUSYO, N.; YAMAJI, K.; KAWAKAMI, Y.; MURAKAMI, H.; KASHIWAGI, S. Correlation between human T cell lymphotropic virus type-1 and *Strongyloides stercoralis* infections and serum immunoglobulin E responses in residents of Okinawa, Japan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, p.71-75, 1997.

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.

HUGGINS, D.; HINRICHESEN, S. L.; ARRUDA, C. S.; MEDEIROS, L. B.; FRAGOSA, V.; OLIVEIRA, E. R. Parasitoses intestinais na infância. **Pediatria Moderna**, v. 6, p. 242-250, 1989.

HUGGINS, D.; MEDEIROS, L. B.; TAVARES, E.; MALTA, L. B.; AGUIAR, T. C. Tratamento da estrogiloidíase humana e outras parasitoses intestinais com dose única de ivermectina. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58, p. 1-4, 2001.

ISHIZAKA, T. IgE and mechanisms of IgE-mediated hypersensitivity. **Annals of Allergy**, v. 48, p. 313-319, 1982.

KOBAYASHI, J.; HASENGAWA, H.; SOARES, E. C.; TOMA, H.; DACAL, A. R. C. D. O.; BRITO, M. C.; YAMANAKA, A.; FOLI, A. A.; SATO, Y. Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Maceio, Brazil, by the agar plate faecal culture method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 279-283, 1996.

KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKAVAT, K.; IELDA, M.; KITA, K.; OHTOMO, H. A. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991.

KORENAGA, M.; NAVA, Y.; TADA, I. IgE response in *Strongyloides ratti*-infected rats with special reference to the life cycle of the parasite. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 72, p. 213-220, 1986.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophag T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARRALDE, C.; MONTOYA, R. M.; SCIUTTO, 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.

LESSNAU, K. D.; CAN, S.; TALAVERA, W. Disseminated *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus-infected patients. Treatment failure and a review of literature. **Chest**, v. 104 p. 119-122, 1993.

LEUNG, V. K.; LIEW, C. T.; SUNG, J. J. Fatal strongyloidiasis in a patient with ulcerative colitis after corticosteroid therapy. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, p. 1383 - 1384, 1997.

LINDO, J. F.; COWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting methods for 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* filiform 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 Diseases Clinics of North America**, v.37, 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. 93, 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.

LYNCH, N. R.; HAGEL, I.; DI PRISCO, M. C.; LÓPEZ, R.; GARCIA, N.; PÉREZ, M. Serum IgE levels, helminthic infection and socio-economic change. **Parasitology Today**, v. 8, p. 166-167, 1992.

LYNCH, N. R.; HAGEL, I.; PÉREZ, M.; DI PRISCO, M. C.; LÓPEZ, R.; ALVAREZ, N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in tropical slum area. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, p. 404-411, 1993.

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 161-164, 1998.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES -PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA- CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulat of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in Indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 52-55, 2001.

McRURY, J.; DE MESSIAS, I. T.; HUITER, T. W.; GENTA, R. M. Specific IgE responses in human strongyloidiasis. **Clinical Experimental Immunology**, v.65 p.631-638, 1986.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v.1, p.507-624, 1948.

NAGESWARAN, C.; CRAIG, P. S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimentally infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology**, v. 108, p. 335-342, 1994.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: Looking at the intestinal mucosae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 291-299, 2001.

NEVA, F. A.; FILHO, J. O.; GAM, A. A.; THOMPSON, R.; FREITAS, V.; MELO, A.; CARVALHO, E. M. A. Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human lymphotropic virus type I and *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p.1856-1859, 1998.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10. ed., Belo Horizonte: Atheneu, 2000, p. 405-414.

NEWTON, R. C.; LIMPUANGTHIP, P.; GREENBERG, S.; GAM, A.; NEVA, F. A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in carrie of HTVL-1 virus with evidence of selective immunossupression. **American Journal of Medicine**, v. 92, p. 202-208, 1992.

NIGON, V.; ROMAN, E. Lé determinismé du sexe el le dévelppement cyclique de *Strongyloides ratti*. **Bulletin biologique Francé Belgica**, v. 63, p. 202 -208, 1952.

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.

NOZAIS, J. P.; THELLIE, M.; DATRY, A.; DANIS, M. Disseminated strongyloidiasis. *Presse Medicin*., v. 30, p. 813 – 818, 2001.

OLIVEIRA, L. C. M.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p. 119-121, 2002.

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.

OVINGTON, K. S.; MCKIE, K.; MATHAEI, K. I.; YOUNG, I. G.; BEHM, C. A. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology*, v.95, p. 488-493, 1998.

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.

PAULA, F. M.; CASTRO, E. D.; 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.

PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Parasitologia Médica*, 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p. 507-515.

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.

PORTO, A. F.; NEVA, F. A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCANTARA, L.; CARVALHO E. M. HTLV-1 decrease Th2 type of immune responses in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunology*, v. 23, p. 503-507, 2001.

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Journal Infectious Diseases*, v. 177, p. 196-203, 1998.

REY, L. **Parasitologia**, 3. ed. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2001, p. 581-590.

RODRIGUEZ C. D.; IGUAL, A. R.; OLTRA A. C.; SANCHEZ S. P.; BUSTAMANTE B. M.; PARRA G. F.; NAGORE, E. E. Agricultural occupation in strongyloidiasis. A case-control study. **Revista Clínica Espanhola**, v. 201, p. 81-84, 2001.

ROITT, I.; BRASTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5 ed. São Paulo: Manole, 1999, 423 p.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; PARTEL, C. D.; TEODORO. L. G. V. L.; 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, 1993.

SANDGROUND, J. H. Speciation and specificity in the nematode genus *Strongyloides*. **Parasitology**, v. 12, p. 59-81, 1925.

SALAZAR, S. A.; GUTIERREZ, C.; BERK, S. L. Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p.141-145, 1995.

SANTOS, J. I.; PADILHA FILHO, O. Baixa sensibilidade do método de cultura de larvas (Harada Mori) no diagnóstico da estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 51-51, 1996.

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.

SCHAFFEL, R.; NUCCI, M.; CARVALHO E.; BRAGA, M.; ALMEIDA, L.; PORTUGAL, R.; PULCHERI, W. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 346 -350, 2001.

SIDDIQUI A. A.; BERCK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infection Diseases**, v. 33, p. 1040-1047, 2001.

SIDDIQUI A. A.; STANLEY, C. S.; BERCK S. L. cDNA encoding a nuclear hormone antigen of steroid/thyroid hormone-receptor superfamily from the human parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology Research**, v. 86, p. 24-29, 2000.

SOUZA - ATTA, M. L. B.; ARAÚJO, M. I.; D'OLIVEIRA-JUNIOR, A.; RIBEIRO -DE-JESUS; ALMEIDA, R. P.; ATTA, M. A.; CARVALHO, E. M. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1101-1105, 1999.

TAKAYANAGUI, O. M.; LOFRANO, M. D.; ARAÚJO, M. D.; CHIMELLI, M. D. 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.; FILLIPI, H. B.; ORIONE, O. Prevalencia de la infección por *Strongyloides stercoralis* en la primera infancia. Orán, Salta (Argentina). **Boletín Chileno Parasitology**, v. 48, p. 49-51. 1993.

TING, Y. M. Pulmonary strongyloidiasis - cases report of 2 cases. **Journal Medical Science**, v. 16, p. 269-274, 2000.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MARAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.

VERCELLI, D.; MONTE, D. L.; MONTICELLI, S.; BARTOLO, D. I. C.; AGREST, A. To E or not to E? Can an IL-4 Induced B cell choose between IgE and IgG4? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 116, p. 1-4, 1998.

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.

WILLCOX, H. P.; COURA, J. R. The efficiency of Lutz, Kato-Katz and Baermann-Moraes (adapted) technique association to the diagnosis of intestinal helminths. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 455-460, 1991.

ZAHA, O., HIRATA, T., KINJO, F., SAITO, A. Strongyloidiasis – Progress in diagnosis and treatment. **Internal Medicine**, v. 39, p. 695-700, 2000.

8 - ANEXOS

Anexo 1

Identificação dos 50 pacientes com diagnóstico parasitológico comprovado para *Strongyloides stercoralis* segundo sexo, idade e resultados laboratoriais, utilizando antígeno de *S. ratti* para os testes ELISA e *Immunoblotting* na detecção de IgE específica

Caso	Sigla	Sexo	Idade (anos)	Índice ELISA IgE (IE)	<i>Immunoblotting</i>
1	PCS	M	39	86,6	Negativo
2	IAL	M	70	87,7	Negativo
3	SMS	F	42	91,9	Negativo
4	NAS	M	40	242,9	+
5	MRP	F	54	207,1	+
6	ANS	M	21	110,4	Negativo
7	VMS	F	65	57,9	Negativo
8	SRP	F	47	84,9	Negativo
9	DS	F	20	94,3	Negativo
10	ABC	F	18	140,2	Negativo
11	JL	M	05	88,2	+
12	BMN	F	28	86,1	Negativo
13	LMG	F	19	236,8	+
14	JCR	M	20	527,5	+
15	ECC	M	54	174,7	+
16	ILR	F	02	55,3	Negativo
17	OMM	M	72	1019,9	+
18	JA	M	43	69,0	Negativo
19	VMS	F	33	59,4	Negativo
20	HSM	M	71	266,6	+
21	JLM	M	10	56,3	Negativo
22	ES	F	38	67,8	Negativo
23	LBR	M	58	123,1	+
24	TSP	F	24	727,3	+
25	LRO	F	65	56,7	Negativo
26	PRR	M	56	64,0	Negativo
27	ACS	M	61	508,0	+
28	EMS	F	21	69,2	Negativo
29	ALT	F	26	191,9	+
30	VSO	M	44	48,5	Negativo
31	PHC	M	02	63,8	Negativo
32	DMO	F	32	200,7	+
33	MFO	M	59	54,7	Negativo
34	BS	M	30	91,9	Negativo
35	HSM	M	71	272,0	+
36	FL	M	65	154,6	+
37	RPM	F	33	124,0	Negativo

38	RSF	M	39	76,7	Negativo
39	MIB	F	32	103,9	Negativo
40	DXM	M	23	71,1	Negativo
41	MJS	F	31	87,7	+
42	ACR	M	39	108,8	Negativo
43	LHM	M	59	166,1	+
44	AJM	M	75	203,6	+
45	VMS	F	33	988,7	+
46	MEC	F	36	213,6	+
47	MCO	F	30	118,0	+
48	NDC	F	20	134,4	Negativo
49	ABR	M	57	470,9	+
50	SMS	F	20	115,6	+

Anexo 2

Identificação dos 38 casos de pacientes com outras parasitoses, segundo sexo, idade e resultados laboratoriais, utilizando antígeno de *S. ratti* para os testes ELISA e *Immunoblotting* na detecção de IgE específica

Caso	Sigla	Sexo	Idade (anos)	Parasitose	Índice ELISA IgE (IE)	Immunoblotting
1	MF	M	07	<i>A. lumbricoides</i>	55,6	-
2	DRS	F	09	<i>A. lumbricoides</i>	51,6	NR
3	IDM	M	04	<i>A. lumbricoides</i>	48,3	NR
4	DAF	F	08	<i>A. lumbricoides</i>	46,6	NR
5	MVT	M	12	<i>A. lumbricoides</i>	51,8	NR
6	TFS	M	08	<i>A. lumbricoides</i>	40,4	-
7	MMR	F	17	<i>A. lumbricoides</i>	68,8	NR
8	LFS	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	52,1	NR
9	DGS	M	14	<i>A. lumbricoides</i>	45,9	NR
10	NC	F	52	<i>A. lumbricoides</i>	48,8	NR
11	RCD	F	14	<i>E. vermicularis</i>	51,8	NR
12	WDS	M	10	<i>E. vermicularis</i>	46,6	-
13	FEG	M	07	<i>E. vermicularis</i>	52,7	+
14	JPS	F	10	<i>E. vermicularis</i>	96,0	-
15	ML	F	09	Ancilostomídeo	60,9	NR
16	LFS	F	13	Ancilostomídeo	47,7	NR
17	MG	F	12	Ancilostomídeo	45,5	NR
18	DFS	M	11	Ancilostomídeo	55,8	NR
19	TSS	F	14	Ancilostomídeo	53,8	NR
20	DPS	F	23	<i>Taenia</i> sp	51,2	-
21	JS	F	25	<i>Taenia</i> sp	53,8	NR
22	SDR	F	40	<i>Taenia</i> sp	49,6	-
23	SMM	F	31	<i>T.trichiura</i>	46,6	NR
24	VFS	M	10	<i>T.trichiura</i>	48,1	NR
25	DMR	M	12	<i>H. nana</i>	43,3	NR
26	LS	M	08	<i>G. lamblia</i>	46,6	NR
27	IJ	F	11	<i>G. lamblia</i>	45,5	NR
28	TMS	F	10	<i>G. lamblia</i>	46,6	NR
29	FG	M	07	<i>G. lamblia</i>	47,5	NR
30	GAP	M	10	<i>G. lamblia</i>	49,2	NR
31	KGS	M	08	<i>G. lamblia</i>	50,5	-
32	RCO	F	07	<i>G. lamblia</i>	52,5	NR
33	LM	M	08	<i>G. lamblia</i>	50,7	NR
34	GLG	M	09	<i>G. lamblia</i>	47,7	NR
35	LSS	M	09	<i>G. lamblia</i>	51,6	-
36	HAR	M	10	<i>G. lamblia</i>	56,0	-
37	VLR	F	25	<i>E. histolytica</i>	53,6	NR
38	MPS	F	62	<i>E. histolytica</i>	50,7	NR

Anexo 3

Identificação dos 38 casos de indivíduos saudáveis, segundo sexo, idade e resultados laboratoriais, utilizando antígeno de *S. ratti* para os testes ELISA e *Immunoblotting* na detecção de IgE específica

Caso	Sigla	Sexo	Idade (anos)	Índice ELISA IgE (IE)	<i>Immunoblotting</i>
1	AMA	F	34	98,5	-
2	DFJ	F	05	86,1	NR
3	DFJ	M	06	90,5	-
4	RFJ	M	44	102,9	-
5	RCC	F	25	88,1	NR
6	GAM	F	26	97,6	-
7	FCB	M	25	84,1	NR
8	IDA	F	62	91,2	-
9	FCS	F	24	65,7	NR
10	RKR	F	19	101,8	-
11	ACM	F	23	74,5	NR
12	SMB	F	28	81,6	NR
13	RMR	M	24	79,9	NR
14	RMS	F	25	84,7	NR
15	CJC	M	21	78,7	-
16	CBC	M	21	102,0	NR
17	LZG	M	17	74,1	NR
18	SGM	M	29	63,4	NR
19	DOR	F	25	69,9	NR
20	JMJ	M	19	76,3	NR
21	MRB	M	22	67,9	NR
22	DAF	F	24	89,2	NR
23	DFR	M	62	77,6	NR
24	TRM	F	02	81,0	NR
25	SVS	F	06	70,5	-
26	JJS	F	25	64,1	NR
27	MMN	F	46	69,2	NR
28	IAS	M	10	81,4	NR
29	AMR	M	05	69,7	NR
30	MIR	F	35	79,0	NR
31	JM	F	22	79,9	NR
32	JC	M	53	81,4	-
33	BCP	F	22	102,5	-
34	LAS	M	23	91,2	NR
35	CVS	F	22	75,0	NR
36	MCS	F	36	65,2	NR
37	BRR	F	11	75,9	NR
38	OVS	M	51	83,5	NR

*NR = Não realizado; - = Negativo

FU-00013657-7