



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



ELIZABETE DE JESUS INÊS

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARASITOLÓGICOS
E IMUNOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO
DA ESTRONGILOIDÍASE**

Salvador
2011

ELIZABETE DE JESUS INÊS

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA
ESTRONGILOIDÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Neci Matos Soares
Co-orientador: Profa. Dra. Márcia Cristina A. Teixeira

Salvador
2011

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Inês, Elizabete de Jesus.

Avaliação de métodos parasitológicos e imunológicos para o diagnóstico da estrongiloidíase / Elizabete de Jesus Inês. - 2011.

72 f. : il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profa. Dra. Neci Matos Soares.

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina A. Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2011.

1. Estrongiloidíase - Diagnóstico. 2. Strongyloides stercoralis. 3. Teste imunoenzimático.
4. Diagnósticos de laboratório - Avaliação. 5. Parasitoses - Diagnóstico - Técnica. I. Soares, Neci Matos. II. Teixeira, Márcia Cristina A. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia.
III. Título.

CDD - 616.965

CDU - 616.34-008.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TERMO DE APROVAÇÃO

ELIZABETE DE JESUS INÊS

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmácia.

Aprovada em 10 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Neci Matos Soares
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Neuza Maria Alcântara Neves
Universidade Federal da Bahia

Ricardo Riccio Oliveira
Universidade Federal da Bahia

Ao
Meu PAI, Sebastião, meu grande e eterno amor
Por todo o esforço na minha criação e educação
Por toda força nos momentos difíceis e amor incondicional,
me apoiando e incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.
A você, que sempre confiou na minha capacidade, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Sebastião Santos Inês, paiho (in memoriam), e vovô (in memoriam) pelos ensinamentos, pelas lembranças, pelos sorrisos cheio de vida, pelo amor e pela força para que eu pudesse concluir esse trabalho.

À Isabel, minha irmã pelo carinho e atenção nos momentos mais difíceis.

A Célio, meu esposo, amigo e parceiro pela paciência e companheirismo incondicional.

Às amigas de todas as horas, amigas irmãs pelo carinho e pela preciosa amizade: Márcia, Cássia, tia Lúcia, tia Linda, tia Kati e Iris.

À Professora Neci Matos Soares pela orientação dedicada neste trabalho, pela paciência, compreensão e por todos os ensinamentos que possibilitaram meu amadurecimento científico, intelectual e pessoal e pela confiança em minha capacidade.

À amiga e professora Márcia Aquino pela disposição e boa vontade em me ajudar, pelas orientações no desenvolvimento deste trabalho.

À Joelma e Mônica, pela grande amizade e por toda a ajuda técnica no preparo do antígeno utilizado neste trabalho e na padronização dos ELISAs.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia, setor de diagnóstico Parasitológico: Joelma, D. Silvéria, Eliene, Tácio, Maurício, Rita e Rosana, pelo cuidado e dedicação na triagem dos pacientes com estrogiloidíase e pelos agradáveis momentos de convívio.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia-Pesquisa: Adson, Flávia, Renata e Sílvia pela amizade e pela harmoniosa convivência.

A Faculdade de Farmácia/UFBA, pela oportunidade fornecida aos alunos de pós- graduação em Farmácia.

Aos amigos da pós- graduação em Farmácia, em especial Ana Karina, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos professores do curso de mestrado Acadêmico em Farmácia, pelas aulas e conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

À FAPESB, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

*Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas...*

Luis Fernando Veríssimo

RESUMO

INÊS, Elizabete de Jesus. **Avaliação de métodos parasitológicos e imunológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase é realizado pela pesquisa de larvas nas fezes utilizando o método de Baermann-Moraes, apesar da cultura em placa de agar (CPA) apresentar maior sensibilidade. Na maioria das infecções pelo *Strongyloides stercoralis*, a carga parasitária é baixa e a eliminação das larvas se faz de maneira intermitente, comprometendo a eficácia e precisão do diagnóstico. A pesquisa de anticorpos circulantes através do imunoensaio (ELISA) possui elevada sensibilidade e é utilizado também no auxílio ao diagnóstico da estrogiloidíase. Os objetivos deste trabalho foram (1) comparar os métodos de CPA, Baermann-Moraes e sedimentação espontânea para o diagnóstico da estrogiloidíase (2) avaliar o padrão de migração das larvas de *S. stercoralis* e ancilostomídeos em placas de agar e o tempo para positividade das culturas, (3) avaliar a interferência da refrigeração das fezes na viabilidade das larvas e (4) padronizar o ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*S. stercoralis*. Para avaliar as sensibilidades dos métodos parasitológicos foram utilizadas 725 amostras de fezes de pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, UFBA, e amostras de soros de 50 pacientes com *S. stercoralis*, 80 de indivíduos com outras parasitoses e 60 soros controles negativos. A CPA mostrou maior sensibilidade tanto para *Strongyloides stercoralis* (95%) como para os ancilostomídeos (77%). As sensibilidades da CPA e do método de Baermann-Moraes reduziram aproximadamente 50% quando as amostras foram conservadas a 4°C. Através do padrão de migração das larvas foi possível realizar a diferenciação de 95,7% das amostras positivas para *Strongyloides stercoralis* e de 96,7% para os ancilostomídeos, confirmadas através da microscopia. O tempo de visualização macroscópica dos caminhos, deixados pelas larvas também variou significativamente ($p < 0,05$) entre *S. stercoralis* e ancilostomídeos, ocorrendo principalmente no primeiro e quarto dias de incubação, respectivamente. No ELISA para detecção de IgG a sensibilidade variou de 72 a 76%, e a especificidade foi de 92,8%, não apresentando diferenças significativas quando o antígeno foi tratado ou não com metaperiodato de sódio. Por outro lado, o ELISA para pesquisa de IgE apresentou sensibilidade de 80 % e após o tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio reduziu para 74% ($p > 0,05$). Enquanto não houve variações nas especificidades, obtidas nos ensaios utilizando soros normais como controles negativos. O número de reações cruzadas de soros de pacientes com outras helmintoses aumentou em torno de 16% quando o antígeno foi tratado com o oxidante. Neste estudo, foi observado que houve uma redução nas médias das densidades ópticas dos soros de pacientes infectados com *S. stercoralis* com relação aos soros normais, quando o antígeno foi tratado com metaperiodato de sódio, demonstrando a importância dos epitopos glicosilados para o reconhecimento dos anticorpos anti-*S. stercoralis*. A depleção de IgG dos soros falso-negativos elevou a sensibilidade do ELISA-IgE, porém houve um aumento do número de reatividades cruzadas. A CPA é o método parasitológico mais sensível para o diagnóstico da estrogiloidíase e deve ser recomendado no diagnóstico de rotina. O ELISA pode ser utilizado no auxílio diagnóstico, principalmente em casos pacientes de imunossuprimidos ou antes de terapia imunossupressora.

Palavras-chave: *Strongyloides stercoralis*. Cultura em placa de agar. ELISA. Metaperiodato de sódio. RF- absorvente.

ABSTRACT

INES, Elizabete de Jesus. **Evaluation of parasitological and immunological methods for diagnosis of strongyloidiasis.** Master Dissertation – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 2011.

Definitive diagnosis of strongyloidiasis is usually made by detection of larvae in stool samples using the Baermann-Moraes method, although fecal cultures in agar plate (CPA) have shown higher sensitivity. In the majority of *Strongyloides stercoralis* infections, the parasite load is low and the larvae output is irregular, influencing the effectiveness and accuracy of diagnosis. The detection of circulating antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has high sensitivity and it is also used as a tool for strongyloidiasis diagnosis. The objectives of this work were (1) to compare the methods of CPA, Baermann-Moraes and sedimentation for diagnosis of strongyloidiasis, (2) to evaluate the migration pattern of the *S. stercoralis* and hookworm larvae and the time for positivity of cultures, (3) to evaluate the influence of stool refrigeration on the viability of larvae and (4) to standardize the ELISA protocol to dilution serum anti-*S. stercoralis* IgG antibodies. To determine the sensitivity of the diagnosis methods, 725 stool samples from patients attending to the Clinical Laboratory Analysis of Faculty of Pharmacy, UFBA and serum samples from 50 patients with *S. stercoralis*, 80 with other parasitic infections and 60 negative control sera were used. The CPA was the most sensitive for both *S. stercoralis* (95%) and for hookworm (77%). The sensitivities of CPA and Baermann-Moraes decreased about 50% when samples were stored at 4° C. The migration pattern of larvae permitted the differentiation of 92 (95.7%) *S. stercoralis* and of 89 (96.7%) hookworm positive samples, confirmed by microscopy. The time for visible tracks on agar varied significantly ($P < 0.05$) between *S. stercoralis* and hookworms, occurring mainly in the first and fourth day of incubation, respectively. The sensitivity of ELISA for IgG anti-*S. stercoralis* range from 72% to 76%, and specificity was 91.7%, not showing significant differences when the antigen was treated or not with sodium metaperiodate. On the other hand, the ELISA for IgE had a sensitivity of 80% and after treatment of the antigen with sodium metaperiodate it significantly decreased to 74% ($P > 0.05$), while the specificities of ELISA-IgE, calculated using normal sera as negative controls, did not present significant variations. However, the number of cross-reactions in ELISA-IgE increased approximately 18% when the antigen was treated with the oxidizing agent. In this study, it was observed a reduction in the mean optical densities of sera from patients infected with *S. stercoralis*, compared with normal serum, when the antigen was treated with sodium metaperiodate, demonstrating the importance of glycosylated epitopes for the recognition by anti-*S. stercoralis* antibodies depletion of IgG from false-negative serum, increased the sensitivity of ELISA-IgE, even though there was an increase in cross-reactivity. The CPA is the most sensitive method for the parasitological diagnosis of strongyloidiasis and it should be recommended for routine diagnosis. ELISA should be used for diagnosis of *S. stercoralis*, especially in cases of immunosuppressed patients or before immunosuppressive therapy.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*. Agar plate culture. ELISA. sodium metaperiodate. RF-absorbent.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonate)
BSA	Albumina bovina
CPA	Cultura em placa de agar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima
ELISA-IgE-CM	ELISA para pesquisa de IgE com antígeno de <i>S. stercoralis</i> tratado com metaperiodato de Sódio
ELISA-IgE-SM	ELISA para pesquisa de IgE utilizando antígeno de <i>S. stercoralis</i> sem tratamento com metaperiodato de Sódio
ELISA-IgG-CM	ELISA para pesquisa de IgG utilizando antígeno de <i>S. stercoralis</i> tratado com metaperiodato de Sódio (NaIO ₄)
ELISA-IgG-SM	ELISA para pesquisa de IgG com antígeno de <i>S. stercoralis</i> sem tratamento com metaperiodato de Sódio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	Vírus linfotrópico humano
Hz	Hertz
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KDa	kilodalton
M	Molar
mL	Mililitro
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
TGF- β	Fator de crescimento transformador Beta
Th	T auxiliador

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPCK/TLCK	N α -tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone
Treg	Células do tipo T regulatórias
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
nm	Nanômetro
N	Normal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A: Larva rabditóide de *S. stercoralis* (1. cápsula bucal curta, 2. esôfago rabditóide, 3. primórdio genital, 4. cauda curta). B: Larva filarióide de *S. stercoralis* (1. cápsula bucal curta, 2. esôfago filarióide, 3. cauda entalhada. 19
- Figura 2** – Características microscópicas (aumento 100 x) dos caminhos traçados no agar pelas larvas. *S. stercoralis* (A) descreve um padrão retilíneo com mudanças suaves de direção (forma de “chicote”) e os ancilostomídeos (B) descrevem um padrão com mudanças abruptas de direção (forma de “serpente”)..... 38
- Figura 3** – Curva ROC obtida na padronização da técnica de ELISA para detecção de IgG anti- *S. stercoralis* 41
- Figura 4** – Níveis séricos de IgG anti-*S. stercoralis* detectados no ELISA. Reações de 178 soros diluídos 1:100: 35 soros de pacientes com estrogiloidíase (●), 80 de pacientes com outras parasitoses (■) e 60 soros controles negativos (▲) (47 de recém-nascidos de mães com parasitológico negativo e 13 de indivíduos adultos saudáveis, com parasitológico negativo)..... 41
- Figura 5** – Níveis séricos de IgG anti-*S. stercoralis* em indivíduos com *S. stercoralis* e com outros enteroparasitos detectados no ELISA, utilizando antígeno tratado com metaperiodato de sódio (ELISA-IgG-CM) e sem tratamento (ELISA-IgG-SM). Foram testados 148 soros diluídos de 1:100: 50 soros de pacientes com estrogiloidíase no ELISA-IgG-CM (●) e no ELISA-IgG-SM (○); 50 soros de pacientes com outras parasitoses intestinais no ELISA-IgG-CM (▲) e no ELISA-IgG-SM (△); 48 soros negativos (35 soros de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis) no ELISA-IgG-CM (◆) e no ELISA-IgG-SM (◇)..... 43
- Figura 6** – Níveis séricos de IgE anti-*S. stercoralis* em indivíduos com estrogiloidíase ou com outros enteroparasitos detectados no ELISA, utilizando antígeno tratado com metaperiodato de sódio (A, ELISA-IgE-CM) e sem tratamento (B, ELISA-IgE-SM). Reação sorológica de 148 soros: 50 soros de pacientes com estrogiloidíase no ELISA-IgE-CM (●) e no ELISA-IgE-SM (○); 50 soros de pacientes com outras parasitoses no ELISA-IgE-CM (■) e no ELISA-IgE-SM (□); 48 soros negativos (35 soros de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis) no ELISA-IgE-CM (▲) e no ELISA-IgE-SM (△). 44
- Figura 7** – Níveis séricos de IgE anti-*S. stercoralis* em indivíduos com estrogiloidíase ou com outros enteroparasitos detectados no ELISA, utilizando soros absorvidos e não absorvidos com RF-Absorbent. Reação sorológica de 59 soros: 20 soros de pacientes com *S. stercoralis* absorvidos (◇) e sem absorver (◆), 27 soros de pacientes com outras parasitoses intestinais absorvidos (△) e sem absorver (▲) e 12 soros de indivíduos saudáveis (7 soros de recém-nascidos e 5 de indivíduos adultos) absorvidos (○) e sem absorver (●) 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Frequência de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos em amostras de fezes de 634 pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, analisadas pelos métodos de cultura em placa de agar (CPA), Baermann-Moraes e sedimentação espontânea. 37
- Tabela 2** – Identificação dos caminhos deixados pelas larvas de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos nas CPAs e confirmação morfológica..... 39
- Tabela 3** – Influência o tempo de incubação das CPAs na identificação dos caminhos deixados pelas larvas de *S. stercoralis* e/ou dos ancilostomídeos. 39
- Tabela 4** – Viabilidade das larvas de *S. stercoralis* em amostras de fezes armazenadas a 4°C examinadas pela CPA e pelo método de Baermann-Moraes. 40
- Tabela 5** – Reatividade cruzada dos soros de pacientes com parasitológico negativo para *S. stercoralis* e positivo para outras parasitoses intestinais no ELISA, utilizando antígeno com tratamento (ELISA-IgG-CM) e sem tratamento com metaperiodato de sódio (ELISA-IgG-SM). 42
- Tabela 6** – Reatividade cruzada dos soros de pacientes com parasitológico negativo para *S. stercoralis* e positivo para outras parasitoses intestinais no ELISA, utilizando antígeno de larvas de *S. stercoralis* tratado (ELISA-IgE-CM) ou não com metaperiodato de sódio (ELISA-IgE-SM). 44

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1.	HISTÓRICO	17
2.2.	O PARASITO	17
2.3.	EPIDEMIOLOGIA	20
2.4.	PATOGENIA.....	21
2.5.	DIAGNÓSTICO	25
2.6.	HIPÓTESE	28
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1.	AMOSTRAGEM DE FEZES E PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	30
4.2.	AMOSTRAGEM DE SOROS	31
4.3.	PRODUÇÃO DE ANTÍGENO	31
4.4.	CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>S. stercoralis</i>	32
4.4.1.	Elisa para detecção de IgG.....	33
4.4.2.	Elisa para detecção de IgE	33
4.4.3.	Avaliação da reatividade de epítopos glicosilados do antígeno de <i>S.</i> <i>stercoralis</i> no ELISA.....	34
4.4.4.	Efeito da Absorção de IgG dos soros na detecção de IgE anti- <i>S. stercoralis</i>	35
4.5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5.	RESULTADOS	37
5.1.	FREQUÊNCIA DE <i>Strongyloides stercoralis</i> E ANCILOSTOMÍDEOS EM AMOSTRAS DE FEZES, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS PARASITOLÓGICOS.	37
5.2.	IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO DE MIGRAÇÃO DAS LARVAS DO <i>Strongyloides</i> <i>stercoralis</i> E DE ANCILOSTOMÍDEOS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....	38

5.3. VIABILIDADE DAS LARVAS DE <i>S. stercoralis</i> EM AMOSTRAS DE FEZES ARMAZENADAS A 4° C	40
5.4. ELISA PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI- <i>Strongyloides stercoralis</i>	40
5.4.1. ELISA para detecção de IgG anti- <i>S. stercoralis</i> utilizando antígeno tratado e não tratado com metaperiodato de sódio	42
5.4.2. ELISA para detecção de IgE anti- <i>S. stercoralis</i> , utilizando antígeno tratado e não tratado com metaperiodato de sódio	43
5.5. EFEITO DA ABSORÇÃO DE IgG DOS SOROS NA DETECÇÃO DE IgE ANTI- <i>S. stercoralis</i>	45
6. DISCUSSÃO	46
7. SUMÁRIO DE RESULTADOS	53
8. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	71
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	71
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO	72

1. INTRODUÇÃO

Strongyloides stercoralis é um nematódeo classificado na ordem Rhabditida, família Strongyloididae e gênero Strongyloides. Neste gênero estão incluídas 52 espécies que são parasitos intestinais obrigatórios de muitos animais vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios (CAMPOS et al., 1985). Estima-se que em torno de 35 milhões de pessoas estão infectadas em todo mundo, com prevalências mais elevadas nas regiões tropicais e subtropicais (KOTHBARY et al., 1999; DE BONA; BASSO, 2008; OLSEN et al.; 2009).

A estrongiloidíase, geralmente cursa sem sintomas em indivíduos imunocompetentes. No entanto, em indivíduos com o sistema imune comprometido, como portadores do vírus linfotrópico humano (HTLV-1), do vírus da imunodeficiência humana (HIV), em pacientes transplantados, portadores de neoplasias, etilistas, com doenças auto-imunes, ou ainda, em uso frequente de glicocorticóides a infecção pode ser fatal, devido à hiperinfecção e disseminação da doença (KEISER; NUTMAN, 2004). O diagnóstico definitivo é realizado pela pesquisa das larvas nas fezes, utilizando o método de Baermann-Moraes, no entanto a liberação das larvas de maneira intermitente torna este método pouco sensível (DE KAMINSKY, 1993). Alguns estudos têm demonstrado que o cultivo em placas de agar é o método parasitológico mais eficaz para detecção das larvas do *S. stercoralis* em amostras fecais (ARAKAKI et al., 1990; KOGA et al., 1991; KOGA et al., 1992). Porém, existe o inconveniente de ser um método que também depende da liberação das larvas nas fezes, o que nem sempre coincide com o período da realização do exame. Além disso, é uma técnica mais laboriosa, se comparada a outros métodos parasitológicos, e a sua realização envolve maior risco de infecção acidental, já que depende da manipulação das larvas infectantes (JONGWUTIWES et al., 1999).

Os métodos imunológicos têm sido pouco utilizados para o diagnóstico da estrongiloidíase, devido às dificuldades na produção e padronização de um antígeno capaz de fornecer boa reprodutibilidade dos ensaios, além da presença de reações falso-positivas. Estas reações podem ser causadas por infecções passadas, devido à memória imunológica, e pela presença de reações cruzadas com soros de pacientes com outras parasitoses (VAN DOORN et al., 2007). Alguns estudos de diagnóstico sorológicos têm utilizado antígenos parasitários tratados com metaperiodato de sódio para oxidar os grupos hidroxila dos açúcares e conseqüentemente elevar a especificidade dos ensaios (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000).

Além do mais, a detecção de anticorpos IgE específicos diminui a reatividade cruzada com outros helmintos, no entanto, ocorre uma perda da sensibilidade em virtude da competição da IgG com os sítios de ligação da IgE (SOUZA-ATTA et al., 1999; COSTA-CRUZ et al., 2003; LEORATTI, 2004).

A utilização de antígenos recombinantes é capaz de elevar a especificidade dos ensaios. No entanto, para o diagnóstico da estrogiloidíase, estes antígenos ainda não são componentes de *kits* diagnósticos disponíveis para comercialização, devido à falta de padronização e operacionalidade necessária à produção em larga escala (KROLEWIECKI et al., 2001; RAVI et al., 2002; SUDRÉ, 2006). Apesar dos avanços da biologia molecular e do emprego de ferramentas no diagnóstico imunológico das parasitoses, o encontro do parasito ainda se faz necessário na confirmação do diagnóstico da estrogiloidíase. Assim, os métodos imunológicos são empregados apenas para triagem de pacientes de risco e em estudos epidemiológicos (REY, 2001; COSTA-CRUZ et al., 2003).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

Strongyloides stercoralis foi descoberto pelo médico francês Louis Alexis Normand e descrito pelo farmacêutico Arthur René Jean Baptiste Bavay, em 1876, enquanto trabalhavam em Toulon, França, analisando fezes de soldados franceses que voltaram do Vietnã, com diarreia severa, conhecida durante anos como diarreia da Cochinchina. Inicialmente Bavay denominou o nematóide como *Anguillula intestinalis*, recebendo o nome atual somente em 1902, quando o parasito foi caracterizado de forma completa (BAVAY, 1876; BAVAY, 1877; ASKANAZY, 1900; CAMPOS; FERREIRA, 2005).

S. stercoralis é uma das espécies considerada de maior importância clínica para o homem, por ser a mais comum no mundo (CHAN et al., 1994). No Brasil, é a única espécie que parasita o homem e foi primeiramente relatada no Rio de Janeiro, por Ribeiro da Cruz, em 1880 (LUZ, 1880; NEVES et al., 2005). Outra espécie que também tem importância na saúde pública na África Central e na Ásia, por causar infecção ao homem é o *Strongyloides fuelleborni* (ASHFORD et al., 1992; GROVE, 1996, LAM et al., 2006). Outras espécies de *Strongyloides* que parasitam animais como cães, gatos, e outros mamíferos foram descritas posteriormente (GENTA, 1986; SHOOP et al., 2002). O *Strongyloides venezuelensis* (RODRIGUES et al., 1985) e o *S. ratti* (SANDGROUD, 1925) são espécies utilizadas como modelos experimentais para estudo da biologia, bem como para produção de antígenos, devido às suas similaridades antigênicas com o *Strongyloides stercoralis* (SATO et al., 1990; TAKAMURE, 1995; BAEK et al., 2003; FERREIRA et al., 2007).

2.2. O PARASITO

S. stercoralis é o principal agente etiológico da estrogiloidíase humana. O ciclo vital inicia-se quando as larvas filarióides (L3), em contato com a pele ou mucosa, após deglutição

de alimentos contaminados, secretam metaloproteases que auxiliam na penetração e na migração das larvas pelos tecidos, atingindo os pequenos vasos, sendo levadas pela circulação venosa até o pulmão. Ao ganhar a circulação sistêmica, as larvas chegam até os capilares alveolares, adentram os alvéolos, bronquíolos, onde os movimentos do epitélio ciliado promovem seu transporte passivo junto com as secreções brônquicas, até a traquéia e a laringe (NEVES et al., 2005). Durante essa migração, ocorre uma muda para o estágio L4. Posteriormente, são deglutidas e atingem o trato gastrintestinal alojando-se na mucosa intestinal, particularmente no duodeno, mergulhadas nas glândulas de Lieber Kuhn e na porção superior do jejuno, onde se transformam em fêmeas partenogenéticas e iniciam a oviposição, dando origem às larvas rabditóides (CONCHA et al., 2005; CAMPOS; FERREIRA, 2005; BENINCASA et al., 2007). Três a quatro semanas após a penetração das formas infectantes, o hospedeiro começa a eliminar as larvas através das fezes (CARVALHO FILHO, 1978; SUDRÉ, 2006).

A maioria das larvas rabditóides nos estágios L1 e L2 são eliminadas nas fezes, entretanto algumas delas sofrem uma segunda ecdise antes de serem expelidas, ou seja, tornam-se filarióides infectantes ainda no intestino grosso do hospedeiro. Estas penetram na mucosa do cólon e reiniciam o ciclo. As larvas rabditóides eliminadas nas fezes podem evoluir para larvas infectantes (filarióides) no solo ou transformar-se em vermes machos ou fêmeas de vida livre (REY, 2001; BENINCASA et al., 2007). A ocorrência dos dois ciclos evolutivos pode ser explicada devido à constituição genética das fêmeas partenogenéticas, que são triplóides ($3n$) e produzem simultaneamente três tipos de ovos, que dão origem a três tipos de larvas rabditóides e de acordo com sua constituição cromossômica podem originar machos (n) ou fêmeas ($2n$) de vida livre, ou larvas filarióides infectantes ($3n$) (SHIWAKU et al., 1988; NEVES et al., 2005).

Vários são os mecanismos de transmissão da estrogiloidíase, sendo que o mais comum é a heteroinfecção, em que ocorre penetração das larvas filarióides pela pele dos pés, mãos e nádegas, atingindo a derme, circulação linfática e sanguínea. Pode ocorrer também a infecção através da ingestão de água e alimentos contaminados com as larvas filarióides. A autoinfecção é outra forma de transmissão, podendo ser externa ou interna. A autoinfecção externa é decorrente da transformação de larvas rabditóides em filarióides infectantes na região anal e perianal, seguido de penetração na mucosa retal, com invasão da rede venosa e ciclo pulmonar. A autoinfecção interna ocorre quando as condições locais do intestino propiciam a evolução do parasito na luz do intestino com invasão direta das larvas pela

mucosa (BRASITUS et al., 1980; CHACÍN-BONILLA, 1991). A autoinfecção é a principal forma de transmissão responsável pela manutenção da doença e pode levar ao desenvolvimento das formas graves, como os casos de hiperinfecção e da estrogiloidíase disseminada (GENTA, 1992; LEMOS et al., 2003).

As características morfológicas e morfométricas das formas parasitárias do *S. stercoralis* são importantes para definição do diagnóstico. Os ovos apresentam uma casca fina, medem de 50-58 μm de comprimento por 30-34 μm de largura e em seu interior são encontradas as larvas de primeiro estágio (larvas rabditóides). Como as larvas eclodem muito rapidamente, é difícil encontrar ovos nas fezes de um indivíduo parasitado (MORAES, 1948; GROVE, 1996). As larvas rabditóides (Figura 1A) medem aproximadamente 385 μm de comprimento por 21 μm de largura, possuem esôfago do tipo rabditóide, estrutura que dá nome a larva, o qual é dividido em três partes: corpo, istmo e bulbo, e ocupa 25 % do comprimento total do corpo. A larva rabditóide apresenta ainda vestibulo bucal curto, primórdio genital evidente e a extremidade posterior (cauda) termina abruptamente (TEIXEIRA, 1997; CAMPOS; FERREIRA, 2005). As larvas filarióides (L3) são originadas da diferenciação das larvas do segundo estágio. Têm em média 505 μm de comprimento por 15 μm de largura, são mais finas e compridas do que as larvas rabditóides (L1). O esôfago é retilíneo e ocupa cerca de 40 a 45% do tamanho da larva, e a cauda apresenta a terminação bífida, conhecida como cauda entalhada (Figura 1B) (TEIXEIRA, 1997; CAMPOS; FERREIRA, 2005; DOS SANTOS et al., 2010).

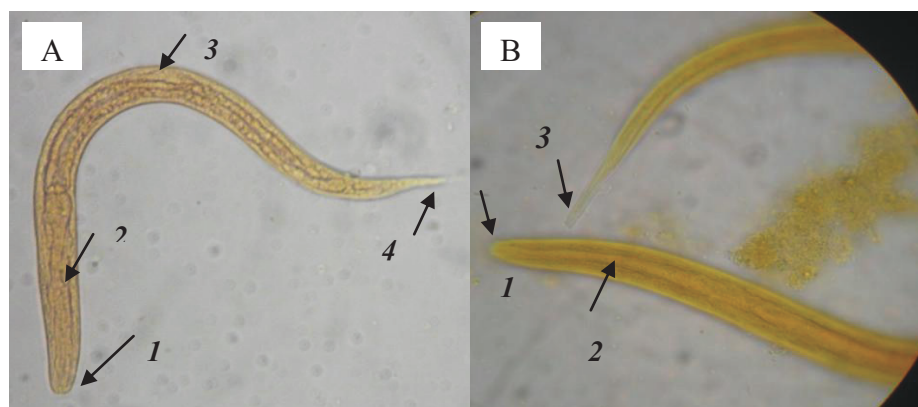


Figura 1 – **A:** Larva rabditóide de *S. stercoralis* (1. cápsula bucal curta, 2. esôfago rabditóide, 3. primórdio genital, 4. cauda curta). **B:** Larva filarióide de *S. stercoralis* (1. cápsula bucal curta, 2. esôfago filarióide, 3. cauda entalhada).

Aumento de 400x

Fonte: Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFBA.

2.3. EPIDEMIOLOGIA

As parasitoses são causas relevantes de agravo à saúde em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente onde as condições sócio-econômicas e culturais permitem a manutenção e disseminação dos parasitos (LUDWING et al., 1999; VAZ, 2001). A estrogiloidíase é uma doença parasitária causada pelo nematóide intestinal *S. stercoralis* com distribuição mundial heterogênea, sendo a prevalência relativamente comum em regiões tropicais e subtropicais (SATO et al., 1995a; KOBAYASHI et al., 1995). Nos trópicos, a doença acomete principalmente as crianças, pelo frequente contato com solos contaminados (GROVE, 1996), enquanto que em países de clima temperado a infecção prevalece em trabalhadores do campo (ROMAN SANCHÉS et al., 2001). Em um estudo realizado na Espanha, com 250 trabalhadores rurais, a prevalência de infecção pelo *S. stercoralis* encontrada foi de 12,4 % (ABRESCIA et al., 2009). Estudos realizados na África, Brasil e Sudeste da Ásia indicaram prevalências variando de 2% a 25% (GBAKIMA; SAHR, 1995; CHAI; HONGVANTHONG, 1998; SANTOS, 2007). O sudeste da Ásia, África subsaariana, América do Sul e a região dos Montes Apalaches nos EUA são consideradas áreas endêmicas para estrogiloidíase (GENTA, 1989; SOROZCAN, 1994).

No Brasil, vários estudos demonstram que a prevalência da estrogiloidíase pode sofrer variações de acordo com as diferentes regiões, populações e métodos utilizados no diagnóstico parasitológico (DE PAULA et al., 2000; MINÉ, 2009). Em Concórdia, Santa Catarina, no período de 2000 a 2002, a análise de 9024 amostras de fezes demonstrou uma frequência variando de 17,6% a 28,3% a depender do ano estudado (MARQUES et al., 2005). No Amazonas, Brasil, a prevalência variou de 6,25% a 9% de acordo com a região e a faixa etária analisada (MATOS, 2000; HURTADO-GUERRERO et al., 2005). Em Uberlândia, MG, um estudo com crianças menores de sete anos demonstrou 13% de infecção pelo *S. stercoralis*, sendo que a maioria dos casos (71,8%) foi somente confirmada após análise da segunda e terceira amostra (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998). Em Holambra, SP, uma pesquisa realizada em cinco fazendas demonstrou que 10,4% dos indivíduos apresentaram exame de fezes positivo para *S. stercoralis* (KOBAYASHI et al., 1995). Também em São José da Bela Vista, SP, houve ocorrência de 8,3% em trabalhadores rurais (TAVARES-DIAS; GRANDINI, 1999). Em Maceió, um estudo com crianças menores de 16 anos, a prevalência encontrada foi de 6% (KOBAYASHI et al., 1996). Na Bahia, a prevalência do *S. stercoralis* em pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor

Edgard Santos pelo Sistema Único de Saúde foi de 4,6%, sendo 7,7 vezes maior do que a dos pacientes atendidos pelo sistema privado, que foi de 0,6% (SANTOS et al., 2007).

Nos últimos anos a associação entre infecção pelo *S. stercoralis*, doenças virais ou outras morbidades que deprimem o sistema imune tem se tornado bastante frequente. Pacientes portadores de HIV apresentam uma variação da prevalência de 2,5 a 21,9% (CIMERMAN et al., 2002; SILVA et al., 2005; CIMERMAN et al., 2006). Em São Paulo, a frequência de *S. stercoralis* em pacientes portadores de HTLV-1 foi de 12%. Na Bahia, um estudo realizado com pacientes portadores HTLV-1, demonstrou uma prevalência de 15,7% (CHIEFFI, 2000; CARVALHO; PORTO, 2004). Em pacientes em uso de corticóides e com doenças neoplásicas a prevalência atinge de 0,84% a 9,1%, dependendo do grau de exposição e outros fatores que favorecem a infecção (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1997; BITTENCOURT et al., 2001; CHEBLI et al., 2006; MACHADO et al., 2008). Em pacientes etilistas principalmente cirróticos, a infecção pelo *S. stercoralis* é bastante elevada, podendo sofrer variações de 40 a 44% (GABURRI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2002).

2.4. PATOGENIA

Os indivíduos infectados pelo *S. stercoralis* podem apresentar as formas aguda e/ou crônica da doença, sendo que na maioria dos casos, a forma crônica cursa de maneira assintomática ou oligossintomática (GROVE, 1996; VELOSO et al., 2008). Na forma aguda, as manifestações clínicas são decorrentes da penetração das larvas filarióides infectantes na pele e da sua migração pelos tecidos, auxiliadas pela ação das metaloproteases, que atuam como um importante fator de virulência (CONCHA et al., 2005; MARUYAMA et al., 2006). Dentre as manifestações dermatológicas mais frequentes podem ser observadas prurido, urticária e erupção eritemato-papulosa na região inferior do tronco, coxas e nádegas, conhecida como *larva currens* (DEVAULT et al., 1990; GORDON et al., 1994; KÁROLYI et al., 1999). Além disso, outras manifestações como febre, tosse não produtiva, artralgia e cefaléia, podem ocorrer (PORTO et al., 2002).

A forma crônica da estrogiloidíase pode variar entre a forma leve, moderada ou grave. A forma leve geralmente é assintomática, enquanto a moderada e grave apresentam

manifestações gastrointestinais, como dor abdominal, vômitos intermitentes, anorexia, diarreia e constipação intestinal (BRASITUS et al., 1980; RONAN et al., 1989; CELEDON et al., 1994; CONCHA et al., 2005; VADLAMUDI et al., 2006). Estas manifestações começam cerca de duas semanas após a infecção e três ou quatro semanas depois as larvas são encontradas nas fezes (CARVALHO-FILHO, 1978). O intenso parasitismo intestinal pode causar lesões mecânicas, com espessamento da parede intestinal, secundária à resposta inflamatória, podendo causar atrofia, ulcerações e conseqüentemente má absorção e diarreia. Este quadro pode evoluir para enteropatia perdedora de proteína, hipocalcemia e outros distúrbios hidroeletrólíticos (GENTA, 1995; HO et al., 1997; CHU; CHIOU, 2006; ZHENG, et al., 2007).

A auto-infecção interna pode levar ao desenvolvimento de quadros graves como a hiperinfecção e disseminação da doença. Isso ocorre devido à evolução das larvas rabditóides para larvas filarióides infectantes, ainda na luz intestinal. Desta forma, vários órgãos como os pulmões, o fígado, o coração, o apêndice e o sistema nervoso central (SNC) podem ser invadidos pelo parasito, agravando o quadro clínico e levando muitos pacientes à morte (SIDDIQUI; BERK, 2001; KEISER; NUTMAN, 2004; VADLAMUDI et al., 2006). Em torno de 15% a 80% dos pacientes com hiperinfecção por *S. stercoralis* e disseminação do parasito evoluem a óbito, provavelmente associado ao diagnóstico tardio (LAM et al., 2006; VADLAMUDI et al., 2006).

Na auto-infecção as larvas estão confinadas nos órgãos envolvidos no ciclo pulmonar (trato gastrointestinal, peritônio e pulmões), embora a septicemia causada por bactérias entéricas possa ocorrer, uma vez que as larvas filarióides transportam bactérias intestinais para a circulação, através das ulcerações intestinais. Quando ocorre um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, o que geralmente acontece em pacientes imunocomprometidos, os pacientes podem desenvolver um quadro de hiperinfecção, observando-se um número aumentado de larvas nas fezes e / ou escarro, com presença de larvas filarióides (HUSNI et al., 1996; TANTON et al., 2002; DE BONA; BASSO, 2008; TEIXEIRA et al., 2010). Os pacientes com estrogiloidíase apresentam sintomas que podem variar da forma aguda à insidiosa, acompanhada de fadiga, mal estar, fraqueza e dores no corpo (WURTZ et al., 1994; THOMAS; COSTELLO, 1998; SIDDIQUI; BERK, 2001; VANDEBOSCH et al., 2008). Possivelmente, a ocorrência destes sinais se deve ao hematofagismo do parasito, as úlceras hemorrágicas e a inflamação da mucosa intestinal.

A infecção disseminada é o termo usado para se referir a migração das larvas para outros órgãos, além daqueles do alcance do ciclo pulmonar, e implica em uma maior gravidade da doença. No entanto, muitos casos de hiperinfecção, mesmo não sendo detectadas larvas fora da via pulmonar, podem ser fatais (GENTA, 1989; LIN et al., 1995; LAI et al., 2002). Na infecção disseminada, as manifestações clínicas variam a depender dos órgãos acometidos. Geralmente os sintomas respiratórios estão presentes e se manifestam como tosse, sibilos, rouquidão, dor torácica, hemoptise, palpitação atrial, fibrilação, dispnéia até colapso respiratório. Também são relatados casos de esofagite, gastrite, duodenite, jejunita, colite, além de colite pseudomembranosa e septicemia bacteriana (SIDDIQUI; BERK, 2001; KEISER ; NUTMAN, 2004; SUAREZ; CERRILLO SÁNCHEZ, 2006).

O exato mecanismo da resposta imune dos hospedeiros frente à infecção pelo *S. stercoralis* ainda não está bem entendido. No entanto, existem evidências mostrando elevação no número de células Th2, de eosinófilos e mastócitos, como também dos níveis de IgE e IgG1 (FINKELMAN et al., 1997). As células do tipo Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e cooperam com os linfócitos B em resposta a estimulação antigênica, na produção de anticorpos (ABBAS et al., 1996). Por sua vez, as citocinas IL-4 e IL-13 estimulam a multiplicação e diferenciação de mastócitos e também das células Th2, favorecendo a produção de outras citocinas, como eotaxina e IL-5, responsáveis pela diferenciação e migração de eosinófilos para o local da infecção (CARA et al., 2000). Estas citocinas atuam na resposta imune, limitando a gravidade da infecção pelo *S. stercoralis*, além de atuar na fisiologia do intestino aumentando o conteúdo de fluidos no trato digestivo. A ligação de IgE aos receptores das células efectoras, especialmente aos mastócitos e aos basófilos, induz a degranulação e liberação de mediadores da inflamação, induzindo a expulsão e morte do helminto. Os mastócitos presentes no intestino liberam proteoglicanas sulfatadas que dificulta a fixação do *S. stercoralis* no epitélio intestinal e estimulam a contração muscular, contribuindo para a expulsão do parasito do intestino (MARUYAMA; NAWA, 1997; MARUYAMA et al., 1998; MARUYAMA et al., 2000; MARUYAMA et al., 2003).

Além do papel protetor da IgE na estrogiloidíase, outras imunoglobulinas como IgA, IgG1, IgG2 também promovem a neutralização de proteases das larvas infectantes durante invasão do tecido, impedindo o desenvolvimento larval. Alguns estudos sugerem que os níveis de anticorpos da classe IgA, presentes nas mucosas, atuam reduzindo a fecundidade do verme e a viabilidade de ovos (ATKINS et al., 1999). A interleucina 4 (IL-4) modula a produção de imunoglobulinas pelas células B ativadas, resultando na maior liberação de IgE e

IgG4. Enquanto a IgE estimula a degranulação dos mastócitos, a IgG4 pode bloquear este processo ao competir com o sítio de ligação de IgE, ligando-se aos mastócitos sem contudo, induzir a degranulação, pois não apresenta sítios de ligação para proteínas do sistema do complemento (BURTON; WOOFF, 1992; JEFFERIS et al., 1995; ATKINS et al., 1999).

Nos casos de co-infecção pelo *S. stercoralis* e o vírus HTLV-1, ocorre um decréscimo da secreção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e da IgE específica. Com a evolução da infecção pelo vírus observa-se uma elevada expressão do IFN- γ e das citocinas produzidas pelas células do tipo T regulatórias (Treg), como o Fator de crescimento transformador Beta (TGF- β) e da IL-10, as quais modulam negativamente a resposta Th2, favorecendo a susceptibilidade à infecção pelo *S. stercoralis* e possível disseminação da doença (PORTO et al., 2001; PORTO et al., 2002; CARVALHO; PORTO, 2004; KEISER; NUTMAN, 2004; MAIZELS et al., 2004; BELKAID, 2007).

Na década de 80, a infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) associada à hiperinfecção pelo *S. stercoralis* era considerada uma doença oportunista (WHO, 1986). Atualmente, muitos trabalhos demonstram que a susceptibilidade à estrogiloidíase por estes pacientes não difere de outros grupos estudados (FEITOSA et al., 2001; KEISER; NUTMAN 2004). Na infecção pelo HIV, observa-se uma progressiva alteração do sistema imunológico, com destruição das células TCD4+, pelo efeito citopático do vírus, ou ainda, pela citotoxicidade mediada pela célula TCD8+. Desta forma, a diminuição quantitativa e a alteração da função das células TCD4+ levam a uma redução da produção das citocinas do tipo Th1, como a IL-2, IFN- γ e TNF- α e conseqüentemente maior susceptibilidade à infecção pelo *S. stercoralis*, principalmente em pacientes com o número de CD4 menor do que 100 células/mm³ (LESSNAU et al.,1993, PINLAOR et al.,2005). A maioria dos casos de hiperinfecção associada à infecção pelo HIV ocorre em pacientes que receberam previamente tratamento com imunossupressores, seja como tratamento adjuvante para pneumonia por *Pneumocystis carinii* (LUCAS, 1990; CIRIONI et al., 1996) ou como parte de um esquema quimioterápico para linfoma não-Hodgkin (DUTCHER et al., 1990).

A infecção pelo *S. stercoralis* em pacientes etilistas pode levar a um quadro de hiperinfecção, possivelmente pelo efeito do etanol no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal elevando os níveis de corticosteróides endógenos (OGILVIE et al., 1998; LASZLO et al., 2001; CHOUDHRY et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2010). Os corticóides atuam estimulando a apoptose de células Th2, reduzindo o número de eosinófilos e desencadeando a inibição da resposta de mastócitos (CHOUDHRY et al., 2004; CHOUDHRY et al., 2006). Em adição,

metabólitos dos corticóides, pela sua similaridade com as ecdisonas, hormônios que regulam o desenvolvimento das larvas, estimulam a diferenciação das larvas rabditóides em filarióides, induzindo a auto-infecção interna e conseqüentemente a hiperinfecção e estrogiloidíase disseminada (CONCHA et al., 2005). O álcool também altera a morfologia das vilosidades intestinais e pode interferir na permeabilidade e na motilidade intestinal, favorecendo a permanência do bolo fecal e a transformação das larvas rabditóides em filarióides, elevando o risco de auto-infecção (WEGENER, et al.,1991; ADDOLORATO et al.,1997).

2.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase é presuntivo, conduzido pela suspeita clínica e epidemiológica, porém os sinais e sintomas são inespecíficos e podem ser confundidos com os de outras enteroparasitoses (NEVES et al., 2005; OLSEN et al.; 2009). Atualmente, o diagnóstico parasitológico é realizado rotineiramente através da pesquisa das larvas em fezes, utilizando o método de Baermann-Moraes. No entanto, na maioria dos casos, a carga parasitária é baixa e a eliminação das larvas se faz de maneira intermitente, comprometendo a eficácia do diagnóstico (LIU; WELLER, 1993). Desta forma, para elevar a sensibilidade do exame parasitológico, várias amostras de fezes devem ser analisadas, em dias alternados, por mais de um método de diagnóstico (SATO et al., 1995b; DREYER et al., 1996; JONGWUTIWES et al., 1999).

A precisão do diagnóstico da estrogiloidíase, para os pacientes com a imunidade comprometida, pode evitar casos de hiperinfecção e infecção disseminada. Assim, vários métodos parasitológicos são utilizados para este fim, como o de Baermann- Moraes (1948), os de concentração por sedimentação (RITCHIE, 1948), a cultura em placa de ágar (ARAKAKI et al., 1988) e a cultura em papel de filtro (HARADA; MORI,1955). Em todos os métodos citados, as larvas do *S. stercoralis* devem ser diferenciadas morfológicamente das larvas dos ancilostomídeos (VALLADA, 1993). Além dos métodos parasitológicos, os métodos sorológicos têm sido utilizados no auxílio ao diagnóstico e em estudos epidemiológicos (SATO et al., 1985; DE KAMINSKY, 1993; SIDDIQUI; BERK, 2001). Mais recentemente, o diagnóstico molecular tem sido aplicado para fins de pesquisas científicas (VERWEIJ et al., 2009). Nos exames parasitológicos, alguns fatores podem alterar a sensibilidade dos métodos

aplicados para o diagnóstico da estrogiloidíase, como por exemplo, fezes pouco homogeneizadas, atraso no processamento, dificuldade na diferenciação morfológica entre as larvas dos nematódeos, uso de coletores contaminados, número e preservação inadequada das amostras (VALLADA, 1993). Entre os métodos utilizados para pesquisa de larvas o Baermann-Moraes é o mais utilizado, apesar de ser menos sensível do que a cultura em placas de agar (CPA). A CPA, além da finalidade de diagnóstico, pode ser utilizada no cultivo das larvas para a produção de antígenos, triagem de novos medicamentos *in vitro* e em cultivo de vermes adultos para estudos da organização do parasito (SUDRÉ, 2006).

Em um estudo comparativo de quatro diferentes métodos (exame direto, formalina-éter, Harada-Mori e cultura em placa de agar) utilizando amostras de fezes de pacientes do Japão, Brasil e Tailândia, a CPA demonstrou maior sensibilidade (SATO et al., 1995b). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos. Kobayashi et al. (1996), demonstraram que 60% de pacientes com *S. stercoralis* não foram diagnosticados quando se utilizou apenas os métodos de Harada-Mori e de concentração pelo formol-éter em comparação com a CPA. Segundo Intapan et al. (2005), o número de larvas eliminadas nas fezes influencia na sensibilidade do método e a CPA apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico da estrogiloidíase, em pacientes com baixa carga parasitária.

Nas culturas em placas de agar, as larvas dos nematódeos deixam caminhos facilmente visíveis a olho nu, devido à presença de colônias de bactérias que formam padrões ondulatórios no agar. Estes padrões, quando visualizados ao microscópio, demonstram que as larvas apresentam diferentes trajetórias de migração no gel: para os ancilostomídeos o movimento é "serpentiniforme" com mudanças abruptas de direção e para o *S. stercoralis* é em forma de "chicote", retilíneo com mudanças suaves de direção (JONGWUTIWES et al., 1999). A possibilidade de utilização dos padrões de migração deixado pelas larvas para realizar o diagnóstico diferencial entre as espécies do *S. stercoralis* e dos ancilostomídeos foi relatada por Jongwutiwes et al. (1999). No entanto, outros estudos não foram realizados para confirmar esta possibilidade.

Os métodos imunológicos utilizados para detecção de anticorpos presentes nos soros ou fluidos biológicos proporcionam boas indicações para o auxílio ao diagnóstico da estrogiloidíase (DE PAULA et al., 2000; REY, 2001; SUDRÉ et al., 2007). Destaca-se também o seu emprego em inquéritos epidemiológicos por apresentar elevada sensibilidade com relação aos métodos parasitológicos. Dentre os métodos sorológicos para detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis*, o mais conveniente e utilizado é o ELISA (ensaio

imunoenzimático) (VAN DOORN et al, 2007). No entanto, devido às dificuldades na produção e padronização de um antígeno com capacidade de reprodutibilidade dos ensaios, seu uso ainda é limitado (DE PAULA et al, 2000). Outra limitação no emprego de imunoenaios é a presença de reatividade cruzada com outros helmintos (COSTA-CRUZ et al., 2003). Estas reações falso-positivas podem ser causadas por estrogiloidíase oculta, infecções passadas, devido à memória imunológica, ou pela presença de antígenos semelhantes entre os helmintos (VAN DOORN et al, 2007). Em locais onde a infecção é incomum a pesquisa de anticorpos revela resultados mais fidedignos.

A realização do diagnóstico através da pesquisa de anticorpos da classe IgE diminui consideravelmente as reações cruzadas, porém, a sensibilidade do ELISA também decresce (COSTA-CRUZ et al., 2003). Além disso, na co-infecção do *Strongyloides stercoralis* com o HTLV-1, a pesquisa de IgE específica, na maioria dos pacientes, é negativa. A infecção pelo HTLV-1 suprime a IgE específica mudando o curso clínico da estrogiloidíase e interferindo no diagnóstico (PORTO et al., 2001). O diagnóstico da estrogiloidíase realizado através da pesquisa de IgE, utilizando como antígeno a “strongylastacin”, enzima secretada pelas larvas filarióides de *S. stercoralis*, demonstrou elevada sensibilidade e especificidade (VARATHARAJALU, et al. 2011).

Sabendo-se das limitações dos métodos parasitológicos, a utilização de testes imunológicos mais sensíveis é de suma importância para auxiliar no diagnóstico da estrogiloidíase. Uma vez padronizado, o ELISA é um teste que possui elevada sensibilidade, sendo considerado superior aos outros testes sorológicos, no que diz respeito à praticidade, segurança e disponibilidade de reagentes (SCHAFFEL et al., 2001; VAN DOORN et al., 2007). Além disso, um grande número de soros pode ser testado simultaneamente, principalmente em inquéritos epidemiológicos (SUDRÉ, 2006). Vários estudos demonstram que a sensibilidade do ELISA para estrogiloidíase varia em torno de 68% a 97% e a especificidade 90% a 100%, sendo superior à maioria dos outros testes sorológicos (CONWAY et al., 1993; LIU; WELLER, 1993; UPARANUKRAW et al., 1999; SCHAFFEL et al., 2001). O ELISA também pode ser aplicado para detecção de antígenos do *S. stercoralis* em amostras de fezes (coproantígeno), embora estes ensaios ainda não estejam bem padronizados (TAWEETHAVONSAWAT et al., 2002).

O Western blotting pode ser utilizado para confirmar o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase, em casos de testes sorológicos discordantes. Silva et al., (2003), demonstraram que 80% dos soros de pacientes com estrogiloidíase reconhecem 11 antígenos

imunodominantes, utilizando antígeno de *Strongyloides ratti*, capazes de definir o diagnóstico. Atkins et al. (1999) evidenciaram que o Western blotting pode diagnosticar os casos de estrogiloidíase com ausência do parasito nas fezes, através do encontro de anticorpos da classe IgA específica. Por outro lado uma variabilidade de padrões de moléculas antigênicas, reconhecidas por soro de pacientes com *S. stercoralis*, tem sido descrita. Por exemplo, Sato et al. (1990), demonstraram quatro moléculas de pesos moleculares de 97, 66, 41 e 26 KDa. Ravi et al. (2002), encontraram uma molécula imunodominante de 38 KDa. Sudré et al. (2007), identificaram duas moléculas de 26 e 33 KDa. Desta forma, ainda não existe um consenso de padrões moleculares imunodominantes do *S. stercoralis* que possam ser usadas como referência no diagnóstico da estrogiloidíase. Outra alternativa de diagnóstico para *S. stercoralis* é a reação em cadeia da polimerase (PCR) que pode facilitar o conhecimento da real prevalência da estrogiloidíase e elevar a sensibilidade do diagnóstico dos pacientes com baixa carga parasitária (VERWEIJ et al., 2009). No entanto, não exclui os falso-negativos, pelo fato de que os pacientes podem eliminar as larvas de maneira intermitente, fazendo-se necessário a repetição de um procedimento de custo muito elevado.

Apesar dos diversos métodos utilizados para o diagnóstico da estrogiloidíase, ainda não existe um padrão ideal para o diagnóstico desta parasitose. Estudos buscando novas abordagens devem ser realizados, principalmente nas áreas endêmicas, como no estado da Bahia.

2.6. HIPÓTESE

A cultura em placa de agar (CPA) é o método mais sensível para o diagnóstico da estrogiloidíase e através da observação do padrão de migração é possível realizar a diferenciação entre as larvas de *S. stercoralis* e ancilostomídeos. O ELISA para a detecção de anticorpos circulantes, reativo ao antígeno bruto de *S. stercoralis* reage com os soros de pacientes com estrogiloidíase e com outras parasitoses intestinais. A oxidação dos epitopos antigênicos glicosilados reduz a reatividade cruzada.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar o diagnóstico parasitológico da estrongiloidíase através do padrão de migração das larvas em CPA e padronizar o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG e IgE anti-*S. stercoralis*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Comparar os métodos parasitológicos de sedimentação espontânea, Baerman-Moraes e a CPA para o diagnóstico da estrongiloidíase;
- 2 Utilizar o padrão de migração das larvas na CPA para diferenciar o *S. stercoralis* dos ancilostomídeos;
- 3 Avaliar a interferência do resfriamento das fezes no diagnóstico da estrongiloidíase pelos métodos de Baermann-Moraes e da CPA;
- 4 Avaliar o efeito da oxidação dos epitopos glicosilados do extrato antigênico de *S. stercoralis*, com o metaperiodato de sódio, na detecção de anticorpos IgG e IgE específicos;
- 5 Verificar o efeito da absorção de IgG na detecção de IgE anti-*S. stercoralis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM DE FEZES E PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Foram utilizadas amostras de fezes de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), no período de Janeiro de 2007 a Junho de 2010. Amostras de cinco a oito pacientes foram selecionadas de maneira aleatória, diariamente, perfazendo um total de 634 amostras (amostragem 1). Todas as amostras foram examinadas pelos métodos parasitológicos de sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e cultura em placas de agar (CPA).

Para avaliar o padrão de migração das larvas dos nematódeos, foram utilizadas 91 amostras de fezes da amostragem 1, com diagnóstico positivo para *S. stercoralis* e/ou ancilostomídeos. Foram selecionados por busca ativa 119 amostras de outros pacientes também atendidos na Faculdade Farmácia (amostragem 2), previamente diagnosticados pelo Baermann-Moraes e pela sedimentação espontânea. No total foram 210 amostras: 115 positivas para *S. stercoralis*, 92 para os ancilostomídeos e três para ambos os parasitos. As amostras foram analisadas pelo método de Baermann-Moraes e semeadas em CPAs, com observação diária, durante sete dias consecutivos, por três observadores independentes. Após a definição do padrão de migração das larvas no sétimo dia, a superfície de cada CPA foi lavada com formalina a 10%, e as larvas foram identificadas através da morfologia.

Para observação da interferência do resfriamento das fezes no diagnóstico da estrogiloidíase, foram utilizadas amostras positivas para *S. stercoralis* com volume suficiente para repetir os exames (amostragem 1 e 2). Cerca de três gramas de fezes foram homogeneizadas e semeadas na CPA e o restante do material fecal foi armazenado a 4°C. Após cada intervalo de 24, 48 e 72 horas de armazenamento, as amostras foram processadas pelos métodos de Baermann-Moraes e CPA, e posteriormente examinadas.

4.2. AMOSTRAGEM DE SOROS

Os soros foram obtidos de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, UFBA, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2010 e de indivíduos saudáveis, assim distribuídos: (1) 50 de pacientes com estrogiloidíase; (2) 80 de pacientes com outras parasitoses intestinais (13 soros de pacientes com ancilostomídeos, 15 com *Schistosoma mansoni*, 16 com *Trichiuris trichiura*, 11 *Trichostrongylus* sp., 23 com *Ascaris lumbricoides* e 2 com *Enterobius vermicularis*); (3) 60 soros controles, com resultados de exames parasitológicos negativos, de três amostras (47 de recém-nascidos de mães com parasitológico negativo e 13 de indivíduos adultos saudáveis, estudantes e professores que fazem parte da equipe do laboratório). Devido a elevada prevalência de parasitoses intestinais em Salvador, Bahia, os soros de recém-nascidos foram incluídos no estudo, para cálculo do cut-off, pelo fato deste grupo não estar exposto aos antígenos parasitários. Apesar da exposição das mães, elas foram triadas levando em consideração o diagnóstico parasitológico negativo de três amostras.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas CEP/FIOCRUZ sob o número 102/2006 (ANEXO A). Os pacientes foram informados da natureza do estudo e aqueles que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B).

4.3. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO

As amostras fecais de pacientes hiperinfectados com *S. stercoralis* foram semeadas em placas de cultura, segundo Arakaki et al., (1990). Resumidamente, a cada placa de Petri (diâmetro de 8,5 cm e profundidade de 1,5 cm) foram adicionados 5 ml do meio de cultivo estéril contendo 1,5% de agar nutriente, 1% de extrato de bife, 1% de peptona e 5% de cloreto de sódio. Posteriormente, 3 g de fezes foram semeadas no centro de cada placa. As placas foram seladas com fita adesiva, para evitar a saída das larvas filarióides (KOGA et al, 1991) e incubadas a 32°C durante 5 dias. As larvas foram recuperadas a partir da lavagem das superfícies das placas com tampão fosfato-salina 0,15M, pH 7,2 (PBS), e lavadas 5 vezes com

o mesmo tampão, a 1,2 x g, por 7 min, a 4°C. Em seguida, o sedimento contendo as larvas foi ressuspenso em 15 ml de hipoclorito de sódio a 0,25% e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, as larvas foram lavadas por mais cinco vezes, como na etapa anterior, contadas em câmara de Neubauer e estocadas a -20°C. Em seguida foram adicionados os seguintes inibidores de proteases: EDTA 5 mM, fenil-metilsulfonil-fluoreto 1mM (PMSF, Sigma), TPCK/TLCK 0,05 mM e Leupeptina 1 µg/mL. No momento da preparação do antígeno as larvas foram descongeladas (43.000 larvas) e sonicadas em ultrassom (Branson Sonifier Cell Disruptor), nove ciclos de 80 segundos a 40Hz. O material foi então centrifugado a 17, 530 x g por 30 min, a 4°C e o sobrenadante foi estocado a - 20°C, após dosagem do seu conteúdo protéico pelo método de Lowry et al (1951).

4.4. CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*S. stercoralis*

A padronização do ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG anti- *S. stercoralis* foi realizada utilizando diferentes concentrações do antígeno, do conjugado anti-IgG humana e duas diluições dos soros. Dentre as concentrações protéicas das preparações antigênicas testadas (2,5; 5; 10 e 20 µg/mL), a concentração de 10 µg/mL foi considerada a mais adequada. Os soros dos pacientes foram testados em duplicata nas diluições de 1:50 e 1:100, sendo que a diluição de 1:100 demonstrou resultados mais satisfatórios. Para a padronização do ELISA para detecção de IgE anti-*S. stercoralis* foi utilizada a mesma concentração de antígeno e cinco diluições seriadas dos soros (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32), sendo que a diluição de 1: 8 demonstrou melhores resultados. O “cut-off” para o ensaio foi estabelecido através da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) utilizando soros controles negativos e soros positivos para *S. stercoralis*. Para o cálculo da especificidade foram utilizados os soros de indivíduos saudáveis, de recém-nascidos e de pacientes com outras parasitoses intestinais. O número de soros utilizado em cada ensaio sofreu variações como descrito em materiais e métodos.

4.4.1. Elisa para detecção de IgG

Para a detecção de IgG anti-*S. stercoralis* foi utilizado 35 soros de pacientes com *S. stercoralis*, 50 de pacientes com outras parasitoses intestinais e 48 dos controles negativos (35 de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis). A cada poço das placas de microtitulação (placas de 96 poços, Corning Inc. Coastar polystyrene EIA/RIA plates) foi adicionado 100 µL do antígeno de *S. stercoralis*, a 10 µg/ml, purificado como descrito no item 4.3, diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,06 M, pH 9,6. Em seguida, as placas foram incubadas por 18 horas, a 4°C e lavadas três vezes com PBS (tampão salina fosfato) a 0,15M, Tween 20 a 0,05%, pH 7,2. Após sensibilização, a cada poço foram adicionados 100 µL de PBS a 0,15 M, Tween 20 a 0,05%, pH 7,2 contendo 5% p/v de leite desnatado (tampão de bloqueio) e as placas foram incubadas em câmara úmida, durante 1 hora, a 37°C, seguido de lavagem como na etapa anterior. Um volume de 100 µl de cada amostra de soro diluído 1:100, em tampão de bloqueio, foi aplicado aos poços, em duplicata e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. As placas foram então lavadas por três vezes, como nas etapas anteriores, e 100 µL do conjugado anti-IgG humana ligada a peroxidase (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, USA) diluído de 1:4000, em PBS a 0,15 M, pH 7,2, contendo 5% p/v de leite desnatado, foram adicionados por poço. Após incubação e lavagem como descritos anteriormente, a reação foi revelada com a adição de 100µL do substrato (100 µL de tampão citrato-fosfato a 0,051 M, pH 5,0 contendo p-fenilenodiamina a 0,0037 M e água oxigenada 30 volumes a 0,04%), seguida de incubação ao abrigo da luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 20 µL de ácido sulfúrico a 8 N, por poço e a leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro, utilizando o filtro de 450 nm (Awareness Technology Inc, USA).

4.4.2. Elisa para detecção de IgE

Foram utilizados 50 soros de pacientes com *S. stercoralis*, 50 de pacientes com outras parasitoses intestinais e 48 dos controles negativos (35 de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis), selecionados aleatoriamente entre a amostragem descrita no item 4.2.

Os poços das placas de microtitulação foram sensibilizados e lavados como no item 4.4.1. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de PBS a 0,15 M, Tween 20 a 0,05%, pH 7,2 contendo 1% p/v de BSA (tampão de bloqueio) e as placas foram incubadas a temperatura ambiente, durante 1 hora, seguido de lavagem com PBS a 0,15 M, Tween 20 a 0,05%, pH 7,2. Um volume de 100 µl dos soros diluídos 1:8, em tampão de bloqueio foi aplicado aos poços em duplicatas. Após lavagem, as placas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, com 100 µL/poço do anticorpo biotilado de cabra anti-IgE (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD, USA), diluído de 1:2000 em PBS a 0,15 M, pH 7,2 contendo 1% p/v de BSA. Após incubação, as placas foram lavadas como descrito anteriormente e foram adicionados 100 µl/poço do conjugado estreptavidina-peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD, USA), diluído a 1:500 em PBS a 0,15 M, contendo 1% p/v de BSA, pH 7,2, seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. A reação foi revelada pela adição de 100 µl do substrato enzimático 0,01M ABTS® (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD, USA), após incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro, utilizando filtro de 405 nm (Awareness Technology Inc, USA).

4.4.3. Avaliação da reatividade de epitopos glicosilados do antígeno de *S. stercoralis* no ELISA.

Para avaliar a possibilidade de reduzir as reações cruzadas no ensaio imunoenzimático, para detecção de anticorpos IgG e IgE anti-*S. stercoralis*, o ELISA foi realizado utilizando antígeno tratado com metaperiodato de sódio e sem tratamento. Foram utilizados 50 soros de pacientes com *S. stercoralis*, 50 soros de pacientes com outras parasitoses intestinais e 48 controles negativos (35 de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis). Os poços das placas de microtitulação foram sensibilizados e lavados como no item 4.4.1 e em seguida, para oxidação dos epitopos glicosilados, foram adicionados 100 µl de metaperiodato de sódio 0,01M, em tampão acetato de sódio a 1,5 mM. As placas foram incubadas por 1 h, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de acetato de sódio a 0,05M e em seguida, foi adicionado 100 µl de borohidreto de sódio a 50 mM, por poço, seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. As

etapas subsequentes foram realizadas como descrito no item 4.4.1, ELISA para detecção de IgG e no item 4.4.2, ELISA para detecção de IgE.

4.4.4. Efeito da Absorção de IgG dos soros na detecção de IgE anti-*S. stercoralis*

Para verificar o efeito da absorção de IgG com RF-Absorbent (absorvente de Fator Reumatóide; Siemens, Marburg, Germany) na detecção de anticorpos IgE anti-*S. stercoralis*, no ensaio imunoenzimático, foram selecionados 20 soros de pacientes com estrogiloidíase, que tiveram resultados falso-negativos na sorologia, 27 soros de indivíduos com outras parasitoses, que apresentaram reações cruzadas, e 12 soros controles negativos, escolhidos aleatoriamente (7 soros de recém-nascidos e 5 de indivíduos adultos saudáveis). Os soros foram diluídos a uma concentração de 1:4 em PBS 0,15 M, Tween 20 a 0,05%, 1% BSA, pH 7,2 e em seguida de 1:2 com o RF-Absorbent, obtendo uma diluição final de 1:8. A mistura foi incubada durante 18 horas, a 4°C, e posteriormente centrifugada durante 5 minutos, a 8,8 x g. Cem microlitros do sobrenadante foram adicionados aos poços das placas de microtitulação previamente sensibilizados, e incubados a 4°C durante 18 horas. As placas foram então lavadas como no item 4.4.2 e as etapas seguintes foram também realizadas como descritas no item 4.4.2, ELISA para detecção de IgE.

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Para comparação das médias entre os diferentes grupos utilizando antígeno tratado e não tratado com metaperiodato de sódio foi utilizado o teste t de Student pareado. As comparações entre os grupos de soros de pacientes com estrogiloidíase, com outras parasitoses e de indivíduos normais foram realizadas utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Dunn. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando o valor de *p* foi menor que 0,05. As comparações entre

as frequências e proporções foram feitas pelo teste de Fisher. Todas as probabilidades dos testes foram feitas para um nível de significância de 95%.

A determinação do poder discriminatório dos ELISAs foi realizada através da curva ROC, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, no qual a sensibilidade e especificidade são calculadas como uma função de diferentes pontos de corte. Nesta análise o valor de 1 menos o valor da especificidade (1-especificidade) é plotado contra o valor de sensibilidade, e em seguida o valor da área sob a curva é calculado (Figura 3).

5. RESULTADOS

5.1. FREQUÊNCIA DE *Strongyloides stercoralis* E ANCILOSTOMÍDEOS EM AMOSTRAS DE FEZES, UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS PARASITOLÓGICOS.

A frequência de *S. stercoralis* e ancilostomídeos investigada por três diferentes métodos, cultura em placa de agar (CPA), Baermann-Moraes e sedimentação espontânea foi de 6,6% (42/634) para *S. stercoralis* e 7,7% (49/634) para ancilostomídeos. A CPA foi o método mais sensível, detectando 95,0% dos casos de estrogiloidíase, quando comparada com o método de Baermann-Moraes (69,0%) e o de sedimentação espontânea (26,2%), como apresentado na Tabela 1. Utilizando a CPA, foram diagnosticados 11 e 30 casos adicionais para *S. stercoralis* e ancilostomídeos, respectivamente, que não foram detectados pelo método de Baerman-Moraes. A análise estatística entre a CPA e o Baermann para o diagnóstico da estrogiloidíase não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$). Tanto a CPA quanto o Baermann-Moraes foram mais sensíveis para recuperação das larvas de *S. stercoralis* quando comparada com a sedimentação espontânea (Teste de Fisher, $p < 0,05$).

Tabela 1 – Frequência de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos em amostras de fezes de 634 pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, analisadas pelos métodos de cultura em placa de agar (CPA), Baermann-Moraes e sedimentação espontânea.

Métodos	<i>Strongyloides stercoralis</i>		Ancilostomídeos	
	Positiva n (%)	Negativa n (%)	Positiva n (%)	Negativa n (%)
Sedimentação espontânea	11(1,7)	623 (98,3)	28 (4,4)	606 (93,6)
Baermann Moraes*	29 (4,6)	605 (95,4)	8 (1,3)	626 (98,7)
CPA **	40 (6,3)	594 (93,7)	38 (6,0)	596 (94,0)
Total ^a	42 (6,6)	592 (94,4)	49 (7,7)	585 (92,3)

*Comparação entre os métodos de Baermann-Moraes e sedimentação espontânea para o diagnóstico do *Strongyloides stercoralis* ($p < 0,05$). **Comparação entre a CPA e sedimentação espontânea para diagnóstico do *S. stercoralis* ($p < 0,05$). ^aNúmero total de amostras positivas ou negativas examinadas pelos três métodos.

Fonte: Autora

5.2. IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO DE MIGRAÇÃO DAS LARVAS DO *Strongyloides stercoralis* E DE ANCILOSTOMÍDEOS PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.

O diagnóstico da estrogiloidíase e ancilostomíase foram realizados utilizando o padrão de migração das larvas nas CPAs (Figura 2). Foram avaliadas amostras de fezes positivas para *S. stercoralis*, para ancilostomídeos e para ambos os parasitos. A concordância do padrão de migração e da morfologia das larvas foi observada em 95,7% (110/115) dos casos de infecção pelo *S. stercoralis*, 96,7% (89/92) casos positivos para ancilostomídeos e 100% (3/3) para as co-infecções (Teste Fisher, $p < 0,05$; Tabela 2).

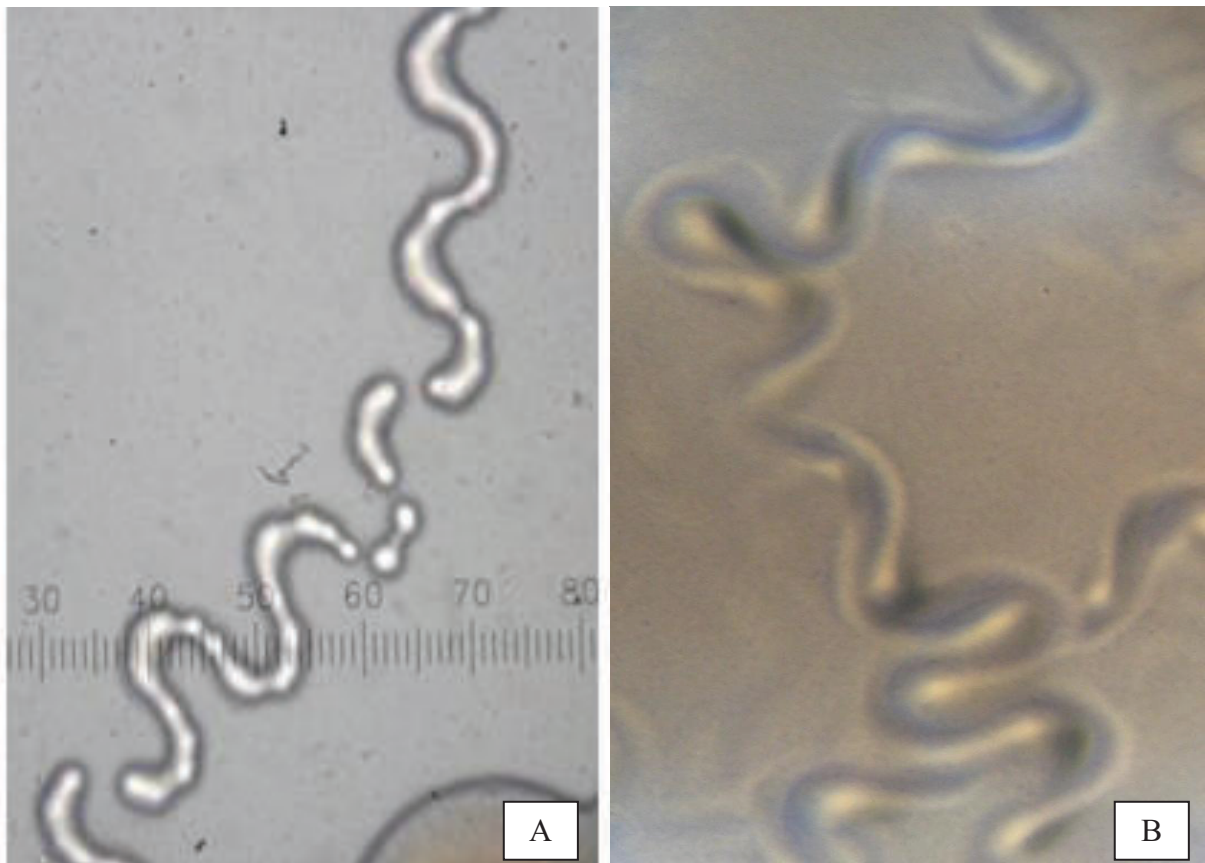


Figura 2 – Características microscópicas (aumento 100 x) dos caminhos traçados no agar pelas larvas. *S. stercoralis* (A) descreve um padrão retilíneo com mudanças suaves de direção (forma de “chicote”) e os ancilostomídeos (B) descrevem um padrão com mudanças abruptas de direção (forma de “serpente”).

Fonte: Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Farmácia, UFBA.

Tabela 2 – Identificação dos caminhos deixados pelas larvas de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos nas CPAs e confirmação morfológica.

Características dos caminhos	Identificação das larvas pela microscopia			Total
	<i>S. stercoralis</i> n (%)	Ancilostomídeos n (%)	<i>S. Stercoralis</i> e ancilostomídeos n (%)	
Movimento em chicote ^a	110 (95,7)	3 (3,3)	-	113
Movimento em serpente ^b	5 (4,3)	89 (96,7)	-	94
Padrão misto ^c	-	-	3 (100)	3
Total	115	92	3	210

^a Os caminhos deixados pelas larvas são relativamente regulares, em linha reta com mudança suave de direção. ^b Os caminhos são relativamente irregulares, torcidos, com mudança abrupta de direção.

^c Ambos os padrões dos caminhos observados no agar.

Fonte: Autora

A identificação do *S. stercoralis* e dos ancilostomídeos, utilizando a CPA variou de acordo com o tempo de incubação das placas. Das 115 amostras de fezes positivas para *S. stercoralis*, 73 (63,5%) se tornaram positivas no primeiro dia de incubação, enquanto para os ancilostomídeos apenas três amostras de 92 (3,3%) foram positivas no mesmo intervalo de tempo (Tabela 3). A positividade das culturas para o *S. stercoralis* e os ancilostomídeos, no primeiro e quarto dia de incubação, respectivamente, demonstrou diferença estatística significativa pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Influência o tempo de incubação das CPAs na identificação dos caminhos deixados pelas larvas de *S. stercoralis* e/ou dos ancilostomídeos.

Tempo de incubação (dias)	Número de amostras positivas ^a (% cumulativa)		
	<i>S. stercoralis</i>	Ancilostomídeos	Mistos
1	73 (63,5)*	3 (3,3)	0
2	27 (87,0)*	3 (6,5)	0
3	8 (94,0)	12 (19,6)	3 (100)
4	7 (100)	49 (72,8)*	0 (100)
5	0 (100)	16 (90,2)*	0 (100)
6	0 (100)	8 (99,0)	0 (100)
7	0 (100)	1 (100)	0 (100)
Total	115	92	3

^aA morfologia das larvas de *S. stercoralis* e ancilostomídeos foi confirmada pelo exame microscópico.*Diferença estatística da associação entre o diagnóstico e intervalo de tempo ($p < 0,05$).

Fonte: Autora

5.3. VIABILIDADE DAS LARVAS DE *S. stercoralis* EM AMOSTRAS DE FEZES ARMAZENADAS A 4° C

O armazenamento a 4° C das amostras de fezes positivas para *S. stercoralis* interferiu na sensibilidade dos métodos parasitológicos. Das 74 amostras reexaminadas pela CPA, a presença das larvas de *S. stercoralis* foi observada em 48,6%, 28,4% e 23,0%, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Resultados similares foram observados quando as amostras foram analisadas pelo método de Baermann-Moraes (Tabela 4).

Tabela 4 – Viabilidade das larvas de *S. stercoralis* em amostras de fezes armazenadas a 4°C examinadas pela CPA e pelo método de Baermann-Moraes.

Análises das amostras em diferentes intervalos de tempo*				
Métodos	0 h (%)	24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)
CPA	74(100)	36 (48,6)	21 (28,4)	17 (23,0)
Baermann-Moraes	72(100)	42 (58,3)	18 (25,0)	12 (16,7)

*Amostras de fezes positivas para *S. stercoralis* e ancilostomídeos, diagnosticadas pelo Baermann-Moraes, foram armazenadas a 4° C e reexaminadas em diferentes intervalos de tempo.

Fonte: Autora

5.4. ELISA PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-*Strongyloides stercoralis*

Dos 35 soros testados inicialmente no ELISA para detecção de IgG anti-*S. stercoralis*, setenta e quatro por cento (26/35) dos soros de pacientes com parasitológico positivo para *S. stercoralis* apresentaram anticorpos reativos a antígenos do parasito. A especificidade do ensaio foi de 92,8% (57/60). A presença de reatividade cruzada foi observada com os soros de pacientes com outras parasitoses intestinais em 8,7% com (7/80) resultados falso-negativos (Figura 3 A, Figura 3B). A Figura 3 mostra a curva ROC obtida na padronização do ELISA para detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis*. A área calculada sob a curva foi de 0,95.

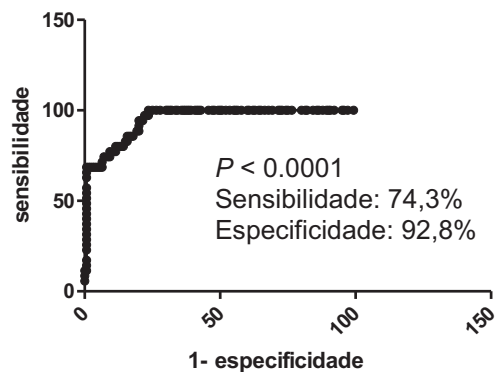
Níveis séricos de IgG anti-*S. stercoralis*

Figura 3 – Curva ROC obtida na padronização da técnica de ELISA para detecção de IgG anti- *S. stercoralis*
 Fonte: Autor

Pela comparação múltipla, utilizando o teste de Dunn (ANOVA), houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos soros de pacientes com *S. stercoralis* ($0,28 \pm 0,14$) e os soros controles negativos ($0,07 \pm 0,06$), como também entre os soros de pacientes com *S. stercoralis* ($0,28 \pm 0,14$) e os soros positivos para outras parasitoses intestinais ($0,08 \pm 0,05$) ($p < 0,05$).

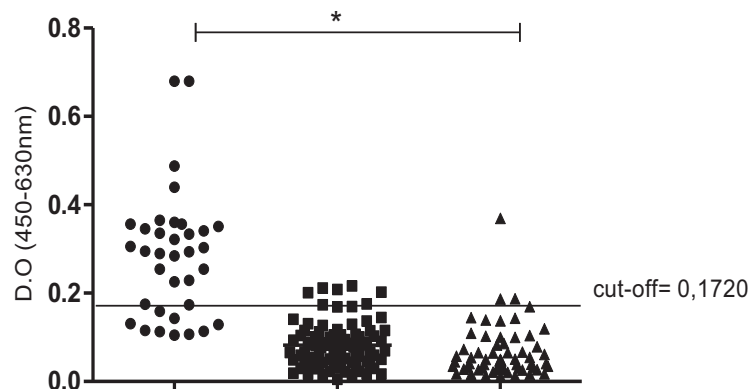


Figura 4 – Níveis séricos de IgG anti-*S. stercoralis* detectados no ELISA. Reações de 178 soros diluídos 1:100: 35 soros de pacientes com estrogiloidíase (●), 80 de pacientes com outras parasitoses (■) e 60 soros controles negativos (▲) (47 de recém-nascidos de mães com parasitológico negativo e 13 de indivíduos adultos saudáveis, com parasitológico negativo). *Comparação múltipla, utilizando o teste de Dunn (ANOVA), entre os grupos de soros de pacientes com *S. stercoralis* e os controles negativos e entre os soros de pacientes com *S. stercoralis* e soros de indivíduos com outras parasitoses ($p < 0,05$).
 Fonte: Autora

5.4.1. ELISA para detecção de IgG anti-*S. stercoralis* utilizando antígeno tratado e não tratado com metaperiodato de sódio

Conforme descrito na metodologia (item 4.4.3), o ELISA para a detecção de IgG anti-*S. stercoralis* foi realizado simultaneamente com antígeno tratado com metaperiodato de sódio (ELISA-IgG-CM) e sem tratamento (ELISA-IgG-SM). O tratamento com metaperiodato de sódio objetivou oxidar os epitopos glicosilados do antígeno de *S. stercoralis* para avaliar a reatividade dos soros. A figura 4, mostra que o tratamento com metaperiodato de sódio não modificou a sensibilidade do ELISA-IgG-CM, de 72% (36/50) com relação ao ELISA-IgG-SM, de 76% (38/50, $p > 0,05$). Utilizando o teste t pareado, não houve diferença estatística entre a média das densidades ópticas dos soros de pacientes com *S. stercoralis* no ELISA-IgG-CM ($0,26 \pm 0,17$) e a média das densidades ópticas dos mesmos soros no ELISA-IgG-SM ($0,29 \pm 0,15$), embora uma redução discreta ocorreu com os soros positivos para *S. stercoralis*. Os resultados das especificidades no ELISA-IgG-CM foi de 84,7% e do ELISA-IgG-SM (91,9%). Reatividade cruzada foi observada principalmente com os soros de pacientes com *Schistosoma mansoni* no ELISA-IgG-CM (Tabela 5).

Tabela 5 – Reatividade cruzada dos soros de pacientes com parasitológico negativo para *S. stercoralis* e positivo para outras parasitoses intestinais no ELISA, utilizando antígeno com tratamento (ELISA-IgG-CM) e sem tratamento com metaperiodato de sódio (ELISA-IgG-SM).

*Soros	Reatividade cruzada com outros parasitos			
	ELISA-IgG-CM		ELISA-IgG-SM	
	Nº de amostras positivas (Total)	(%)	Nº de amostras positivas (Total)	(%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	5 (10)	50%	2 (10)	20%
Ancilostomídeos	3 (10)	30%	2 (10)	20%
<i>Trichuris trichiura</i>	1 (10)	10%	1 (10)	10%
<i>Trichostrongylus sp.</i>	1 (9)	11,1%	0 (9)	0%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 (9)	11,1%	0(9)	0%
<i>Enterobius vermicularis</i>	0 (2)	0%	0 (2)	0%
Total	11 (50)	22%	5 (50)	10%

*Soros de pacientes com parasitológico de fezes positivo apenas para um helminto.

Fonte: Autora

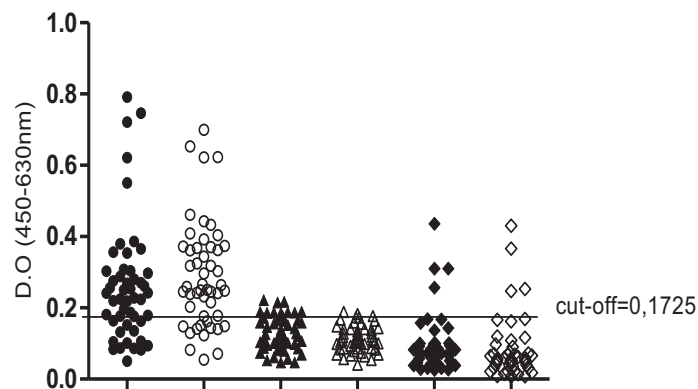


Figura 5 – Níveis séricos de IgG anti-*S. stercoralis* em indivíduos com *S. stercoralis* e com outros enteroparasitos detectados no ELISA, utilizando antígeno tratado com metaperiodato de sódio (ELISA-IgG-CM) e sem tratamento (ELISA-IgG-SM). Foram testados 148 soros diluídos de 1:100: 50 soros de pacientes com estrogiloidíase no ELISA-IgG-CM (●) e no ELISA-IgG-SM (○); 50 soros de pacientes com outras parasitoses intestinais no ELISA-IgG-CM (▲) e no ELISA-IgG-SM (△); 48 soros negativos (35 soros de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis) no ELISA-IgG-CM (◆) e no ELISA-IgG-SM (◇).
Fonte: Autora

5.4.2. ELISA para detecção de IgE anti-*S. stercoralis*, utilizando antígeno tratado e não tratado com metaperiodato de sódio

A frequência de pacientes com estrogiloidíase, confirmada pelo parasitológico de fezes, apresentando anticorpos IgE reativos ao antígeno de *S. stercoralis* sem tratamento com metaperiodato de sódio (ELISA-IgE-SM) acima do limite de corte foi de 80 % (40/50), enquanto no ELISA com antígeno tratado com metaperiodato de sódio (ELISA-IgE-CM) foi de 74% (37/50), não apresentando diferenças significativas na sensibilidade entre os ensaios, (Teste t pareado, $p > 0,05$). Entretanto, a média das densidades ópticas dos soros de pacientes com *S. stercoralis* no ELISA-IgE-CM ($1,33 \pm 0,41$) foi menor que a média das densidades ópticas dos mesmos soros no ELISA sem tratamento com metaperiodato de sódio (ELISA-IgE-SM) ($1,47 \pm 0,49$) (Figura 5). Os resultados das especificidades do ELISA-IgE-CM foi de 75,5% e do ELISA-IgE-SM foi de 83,7% ($p > 0,05$). A presença das reações cruzadas no ELISA-IgE-SM foi de 30% (15/50), enquanto no ELISA-IgE-CM foi de 46% (23/50). O maior número de reatividades cruzadas foi observado nos soros de pacientes com *Schistosoma mansoni* e ancilostomídeos (Tabela 6).

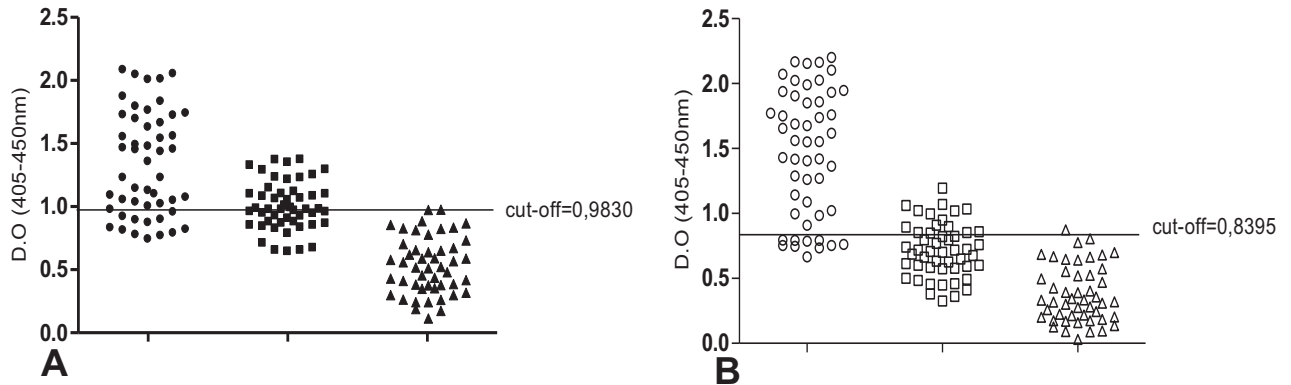


Figura 6 – Níveis séricos de IgE anti-*S. stercoralis* em indivíduos com estrogiloidíase ou com outros enteroparasitos detectados no ELISA, utilizando antígeno tratado com metaperiodato de sódio (A, ELISA-IgE-CM) e sem tratamento (B, ELISA-IgE-SM). Reação sorológica de 148 soros: 50 soros de pacientes com estrogiloidíase no ELISA-IgE-CM (●) e no ELISA-IgE-SM (○); 50 soros de pacientes com outras parasitoses no ELISA-IgE-CM (■) e no ELISA-IgE-SM (□); 48 soros negativos (35 soros de recém-nascidos e 13 de indivíduos adultos saudáveis) no ELISA-IgE-CM (▲) e no ELISA-IgE-SM (△).

Fonte: Autora

Tabela 6 – Reatividade cruzada dos soros de pacientes com parasitológico negativo para *S. stercoralis* e positivo para outras parasitoses intestinais no ELISA, utilizando antígeno de larvas de *S. stercoralis* tratado (ELISA-IgE-CM) ou não com metaperiodato de sódio (ELISA-IgE-SM).

	Reatividade cruzada com outros parasitos			
	ELISA-IgE-CM		ELISA-IgE-SM	
*Soros	Nº de amostras positivas (Total)	(%)	Nº de amostras positivas (Total)	(%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	7 (10)	70%	5(10)	50%
Ancilostomídeos	6 (10)	60%	4 (10)	40%
<i>Trichuris trichiura</i>	6(10)	60%	2 (10)	20%
<i>Trichostrongylus sp.</i>	1 (9)	11, 1%	1 (9)	11,1%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3 (9)	33,3%	3 (9)	33,3%
<i>Enterobius vermicularis</i>	0 (2)	0%	0 (2)	0%
Total	23 (50)	46%	15 (50)	30%

*Soros de pacientes com parasitológico de fezes positivo para apenas um helminto intestinal

Fonte: Autora

A análise da reatividade entre o grupo de pacientes com *S. stercoralis* e de indivíduos sadios e entre o grupo de soros de pacientes com *S. stercoralis* e de pacientes com outras parasitoses demonstrou diferenças significativas, tanto no ELISA-IgE-SM ($p < 0,05$) como no ELISA-IgE-CM ($p < 0,05$).

5.5. EFEITO DA ABSORÇÃO DE IgG DOS SOROS NA DETECÇÃO DE IgE ANTI-*S. stercoralis*

Com o objetivo de elevar a sensibilidade do ELISA para detecção de IgE anti-*S. stercoralis* utilizando antígeno sem tratamento com metaperiodato, os soros de pacientes infectados com *S. stercoralis* foram tratados com RF- absorbent (Materiais e Métodos, item 4.4.4), para depleção de IgG. O número de soros absorvidos reativos ao antígeno de *S. stercoralis* sem tratamento com metaperiodato de sódio aumentou de 45% (7/20) para 75% (15/20), demonstrando diferença estatisticamente significante através do teste Fisher ($p < 0,05$). No entanto, ocorreu também um aumento do número de reações cruzadas de 63,0% (17/27) para 88,9% (24/27) (Figura 6).

Pela comparação múltipla do teste de Dunn (ANOVA), a análise dos resultados entre os grupos de soros testados no ELISA para detecção de IgE (pacientes com *S. stercoralis* versus indivíduos normais; pacientes com *S. stercoralis* versus pacientes com outras parasitoses intestinais) demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$). No entanto, a análise entre o grupo de soros absorvidos de pacientes com *S. stercoralis* com o de pacientes com outras parasitoses não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$).

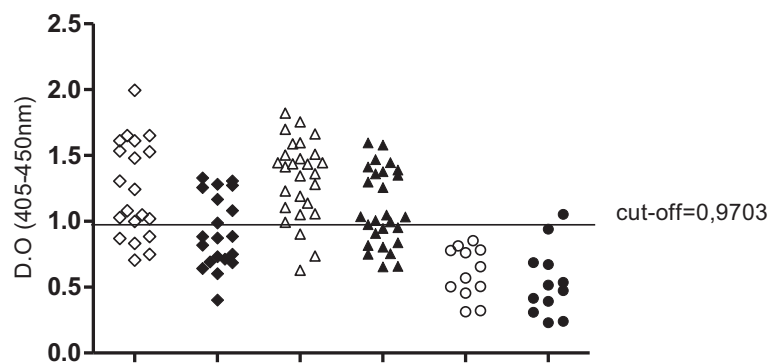


Figura 7 – Níveis séricos de IgE anti-*S. stercoralis* em indivíduos com estrogiloidíase ou com outros enteroparasitos detectados no ELISA, utilizando soros absorvidos e não absorvidos com RF-Absorbent. Reação sorológica de 59 soros: 20 soros de pacientes com *S. stercoralis* absorvidos (◇) e sem absorver (◆), 27 soros de pacientes com outras parasitoses intestinais absorvidos (Δ) e sem absorver (▲) e 12 soros de indivíduos saudáveis (7 soros de recém-nascidos e 5 de indivíduos adultos) absorvidos (○) e sem absorver (●).

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase geralmente é feito por meio da detecção de larvas nas fezes. No entanto, o *S. stercoralis* é um dos parasitos intestinais mais difíceis de ser diagnosticado, devido à baixa carga parasitária e a eliminação intermitente das larvas nas infecções subclínicas, assim a verdadeira prevalência de *S. stercoralis* é subestimada (DREYER et al., 1996; UPARANUKRAW et al., 1999). No Brasil, a frequência das infecções por *S. stercoralis* e outros parasitos podem variar consideravelmente, dependendo da população estudada, da eficiência da técnica de diagnóstico e do número de amostras analisadas (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998; OLIVEIRA et al., 2002; JARDIM-BOTELHO et al., 2008; FONSECA et al., 2010). No presente estudo, a frequência da infecção para o *S. stercoralis* foi de 6,6% e para os ancilostomídeos de 7,2%, semelhantes às encontradas em outros estudos (SANTOS et al., 2007; MACHADO et al., 2010).

O método da cultura em placas de agar (CPA) é considerado mais eficiente para detecção de larvas de nematódeos do que os outros métodos convencionais, adotados em laboratórios clínicos (ARAKAKI et al., 1988, ARAKAKI et al., 1990; DE KAMINSKY, 1993; MARCHI BLATT; CANTOS, 2003, HIRATA et al., 2007). Neste estudo, os métodos de Baermann-Moraes e o de sedimentação espontânea falharam em detectar 11 e 29 casos de estrogiloidíase, respectivamente, que foram diagnosticados pela cultura em placa de ágar. A CPA também foi mais eficaz do que os métodos de sedimentação espontânea e de que o de Baermann-Moraes para o diagnóstico da ancilostomíase, confirmando dados da literatura (KOGA et al., 1990; DREYER et al., 1996; KNOPP et al., 2008).

Apesar da comprovada eficácia da CPA, o método de Baermann-Moraes identificou dois casos positivos para *S. stercoralis*, que não foram diagnosticados pela CPA, indicando que o uso de dois métodos simultâneos torna o diagnóstico mais eficiente. A elevada sensibilidade da CPA para o diagnóstico da estrogiloidíase pode ser devido a maior sobrevivência das larvas no gel e o encontro de estágios de vida livre do nematódeo liberando as larvas (SALAZAR et al., 1995; MARCHI BLATT; CANTOS, 2003). Além disso, vários estudos demonstram que a utilização de amostras múltiplas aumenta a sensibilidade do diagnóstico parasitológico, devido a intermitência da eliminação dos ovos e/ou larvas de helmintos nas fezes (NIELSEN; MOJON, 1987; LIU; WELLER, 1993; HIRATA et al., 2007). Mesmo utilizando apenas uma amostra para o diagnóstico da estrogiloidíase, a CPA é

bastante sensível, porém, demanda mais tempo para liberação dos resultados, tem custo mais elevado do que os métodos parasitológicos convencionais, além de maior risco de infecções percutâneas, pela presença das larvas filarióides, razões pelas quais os laboratórios clínicos não a adotam. Uma forma de evitar o contato mais direto com as larvas, eliminando a etapa de lavagem da placa, pode ser através da realização do diagnóstico pela observação microscópica dos diferentes padrões de migração, ainda pouco explorado. Também o tempo de incubação associado à presença dos padrões de migração pode sugerir a diferenciação entre os parasitos, uma vez que a maioria das amostras positivas para os ancilostomídeos levou mais tempo para se tornar positiva do que as amostras positivas para o *S. stercoralis*, confirmando dados da literatura (JONGWUTIWES et al., 1999).

Tanto as larvas do *S. stercoralis* como as dos ancilostomídeos descrevem caminhos no agar, no entanto as características desses caminhos são diferentes entre estes parasitos (ARAKAKI et al., 1990; JONGWUTIWES et al., 1999). Para o *S. stercoralis* o movimento é retilíneo com mudanças suaves de direção, enquanto para os ancilostomídeos é irregular com mudanças abruptas de direção (JONGWUTIWES et al., 1999). Nesse estudo, o diagnóstico de 110 pacientes infectados com *Strongyloides stercoralis*, 89 com ancilostomídeos e 3 com ambas as infecções, realizado previamente pelo Baermann-Moraes foi reavaliado, com amostras de fezes frescas, pela observação dos padrões de migração das larvas nas CPAs e pelo Baermann-Moraes. Os resultados mostraram concordância entre os padrões de migração e as características morfológicas de 95,7% (110/115) para o *S. stercoralis*, e de 96,7% (89/92) para os ancilostomídeos e de 100% (3/3) para ambos os parasitos estudados, confirmando a possibilidade da diferenciação entre eles, como sugerido em outro estudo (DOS SANTOS NETO, 1993).

Os padrões de migração deixados pelas larvas de *S. stercoralis* no gel foi evidenciado em 87% das amostras (100/115), com dois dias de incubação das CPAs, enquanto para os ancilostomídeos apenas 6,5% (3/92) foram positivas, permitindo assim a caracterização do *S. stercoralis* com menos tempo de incubação das placas. Isto se deve ao fato de que os ovos de *S. stercoralis* sofrem eclosão no intestino, no momento da oviposição da fêmea e as larvas são liberadas nas fezes, enquanto os ovos de ancilostomídeos requerem um tempo mais prolongado para eclosão, liberação das larvas e conseqüente aparecimento dos caminhos (ARAKAKI et al., 1990, JONGWUTIWES et al., 1999). O diagnóstico das amostras positivas para *S. stercoralis* e para os ancilostomídeos que não foi confirmado pelos caminhos 4,3% (5/115) e 3,3% (3/92), respectivamente, foi realizado no quarto dia de incubação das CPAs,

dificultando a visualização dos padrões de migração das larvas, pelo intenso crescimento de colônias de bactérias. Portanto, o tempo de incubação pode ser um indicativo de diferenciação entre os parasitos.

A escolha de um método para o diagnóstico parasitológico de rotina deve levar em conta a sensibilidade, como também, o tempo de realização e os custos. Os resultados aqui apresentados mostraram que o método da CPA é o mais sensível para o diagnóstico de larvas de nematódeos e que a utilização do padrão de migração das larvas, associada ao tempo de incubação torna o diagnóstico mais preciso, rápido e de fácil execução.

Devido às dificuldades de acesso dos pacientes ao laboratório, além das dificuldades fisiológicas relacionadas com a coleta da amostra e o transporte em poucas horas, a realização do diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase tem sido negligenciado. Até o momento, não existe uma alternativa viável para o diagnóstico, com elevada sensibilidade, utilizando fezes conservadas. Tanto o diagnóstico através da CPA quanto do Baermann-Moraes se baseia na viabilidade das larvas e a utilização de fezes conservadas dificulta a realização dos métodos. A utilização de amostras conservadas a 4°C poderia facilitar o diagnóstico, através destes métodos, porém não existem estudos prévios que comprovem a viabilidade das larvas em fezes refrigeradas. Os dados obtidos neste estudo demonstram que o diagnóstico da estrogiloidíase tanto pela CPA quanto pelo método de Baermann-Moraes reduz a sensibilidade em aproximadamente 50%, quando as amostras foram refrigeradas por 24 horas. As sensibilidades dos métodos foram reduzidas consideravelmente com o prolongamento do tempo de refrigeração, indicando que o uso de fezes mantidas a 4°C não é recomendado para o diagnóstico da estrogiloidíase. Nas CPAs, 17 amostras (23%) permaneceram positivas após 72 horas de refrigeração, enquanto no Baermann-Moraes apenas 12 (16,7%). Provavelmente estes pacientes tinham uma elevada carga parasitária ou até uma hiperinfecção, onde o material fecal já continha algumas larvas em estágios intermediários ou filarióides, que possivelmente são mais resistentes a baixas temperaturas, contribuindo para a manutenção da positividade dos métodos utilizados.

Muitos casos de infecção por *S. stercoralis* não são diagnosticados quando os métodos convencionais são utilizados. Um método parasitológico sensível como a CPA deve ser recomendado na rotina dos laboratórios clínicos. Além de ser um método de baixo custo em relação aos imunológicos, é de fácil execução e a observação dos caminhos associado ao tempo de incubação evita o contato direto com as larvas filarióides, além de reduzir o tempo de diagnóstico.

Nas infecções subclínicas, os pacientes possuem uma carga parasitária baixa, dificultando ainda mais o encontro das larvas. Assim, a utilização de testes sorológicos pode ser uma alternativa, principalmente para o diagnóstico preventivo da estrogiloidíase disseminada em pacientes imunossuprimidos.

Neste estudo, a sensibilidade do ELISA para detecção de IgG anti-*S. stercoralis* variou de 72% a 76% e a especificidade de 91,8 % a 92,8%, semelhante aos dados relatados na literatura (GENTA,1988; SCHAFFEL et al., 2001; SUDARSHI et al., 2003; NEWBERRY et al., 2005). Por outro lado, outros estudos demonstraram sensibilidades mais elevadas, acima de 90% (COSTA-CRUZ et al., 1999; KOOSHA et al., 2004; VAN DOORN et al., 2007; RAMANATHAN et al., 2008). Estas diferenças se devem, possivelmente, as diferentes populações estudadas, ao estágio da doença, ou ainda as variações do imunoensaio; como tipo de antígeno, diluições dos soros e tipo de anticorpo conjugado (JOHNSTON et al., 2005).

Um problema comum em ensaios para a detecção de anticorpos contra antígenos parasitários é a presença de reações cruzadas, principalmente em áreas com elevada prevalência de parasitoses. No ELISA para detecção de IgG, padronizado neste estudo, a percentagem de reações cruzadas variou de 8,7% a 10% (LIU ; WELLER, 1993) concordando com relatos da literatura (HUAMAN et al., 2003; MUCK et al., 2003; YORI et al., 2006; MOTA-FERREIRA et al., 2009). Esta reatividade cruzada pode está associada à similaridade antigênica entre os helmintos, a presença da infecção não diagnosticada e/ou a exposição prévia dos indivíduos que vivem em áreas com elevada prevalência de helmintos intestinais (NEVA et al.,1981; SCHAFFEL et al., 2001; SANTOS et al., 2007). Além disso, o diagnóstico através da pesquisa de IgG não diferencia uma infecção recente de uma infecção crônica ou exposição prévia (LIU; WELLER, 1993), podendo os níveis de IgG antígeno-específico persistir por um tempo prolongado, na ausência de reexposição (MAIZELS et al.,1993; LINDO et al.,1996, KARUNAJEEWA et al., 2006).

Dados da literatura indicam que a presença IgE circulante pode ser um marcador de infecção recente. Além disso, a pesquisa de IgE tem mostrado maior especificidade em relação a de IgG, com redução do número de reatividade cruzada com outros parasitos intestinais (CONWAY et al., 1993). Os dados aqui apresentados, demonstram que a sensibilidade do ELISA para pesquisa de IgE foi de 74% e a especificidade foi de 97,9%, concordando com outros estudos (NEVA et al.,1981; CONWAY et al., 1993; UPARANUKRAW et al., 1999; SCHAFFEL et al., 2001). No entanto, não ocorreu redução da reatividade cruzada para outros helmintos, o que pode ser explicado pela exposição frequente

dos pacientes a infecção pelo *S. stercoralis* e manutenção de uma carga parasitária baixa, não sendo diagnosticada através da pesquisa das larvas. Vale ressaltar que os pacientes com pesquisa de IgE positiva e com diagnóstico parasitológico negativo devem ser encaminhados para a reavaliação frequente, quanto ao diagnóstico parasitológico. Principalmente, aqueles com a imunidade comprometida.

A presença de resultados falso-negativos no ELISA aqui padronizado, pode ser atribuída a produção de baixos níveis de anticorpos, indetectáveis no imunoensaio, devido a baixa carga parasitária nas infecções crônicas. Na estrogiloidíase disseminada, os pacientes geralmente possuem baixos níveis de IgE circulantes e na maioria das vezes a pesquisa de IgE é negativa (HAYASHI et al., 1997, ATKINS et al., 1998, PORTO et al., 2001, CARVALHO; PORTO, 2004).

A absorção dos soros com antígenos de outros helmintos tem sido utilizada para reduzir as reações cruzadas nos ensaios para detecção de anticorpos anti-parasitas específicos (CONWAY et al., 1993). Porém, as dificuldades em obtenção de antígenos de vários helmintos, exigindo muitas vezes modelos experimentais, tornam esta abordagem inviável para o imunodiagnóstico. Alguns trabalhos demonstram que o tratamento de antígenos parasitários com metaperiodato de sódio (NaIO_4) oxida os grupos hidroxila dos açúcares a aldeídos em pH ácido, reduzindo os epitopos glicosilados, e conseqüentemente as reações inespecíficas (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000). Atta et al. (2004), observaram uma redução da reatividade cruzada entre o antígeno de *Schistosoma mansoni* com os soros de pacientes infectados com outras parasitoses, quando o antígeno foi tratado com metaperiodato de sódio. Também, no imunodiagnóstico da equinococose, a oxidação dos epitopos glicosilados reduziu a reatividade cruzada (ALARCÓN DE NOYA et al., 2000; KOUGUCHI et al., 2011). No presente estudo, os ELISAs para detecção de IgG e IgE anti-*S. stercoralis*, utilizando antígeno tratado e não tratado com metaperiodato de sódio, não mostrou diferenças significativas nas sensibilidades dos ensaios. Embora tenha ocorrido uma redução discreta na média das densidades ópticas dos soros positivos para *S. stercoralis* em relação aos soros normais. Esta observação sugere que a oxidação dos epitopos antigênicos glicosilados reduziu a imunorreatividade e, portanto são importantes no reconhecimento de anticorpos anti-*S. stercoralis*, como demonstrado previamente no imunodiagnóstico da hemococose e da teníase (SCHALLIG; VAN LEEUWEN, 1996; OBREGÓN- HENAO et al., 2001; VERVELD et al., 2003).

O tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio pode modificar a reatividade cruzada dos soros de pacientes com parasitoses intestinais. Alarcón de Noya et al. (2000), demonstraram que a utilização de antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni*, tratado com metaperiodato de sódio, diminuiu o número de reações cruzadas com os soros de pacientes infectados com outros parasitos. Kouguchi et al. (2011), também encontrou resultados semelhantes, na padronização do imunodiagnóstico da equinococose. No imunoenensaio aqui padronizado, tanto para pesquisa de IgG como de IgE, o número de reações cruzadas foi mais elevado no ELISA tratado com metaperiodato de sódio, do que no ELISA sem tratamento, concordando com os dados de padronização do ELISA para diagnóstico da paracoccidiodomicose (ALBUQUERQUE et al., 2005). Estas diferenças de reatividade cruzada, após tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio, possivelmente estão relacionadas à exposição de epitopos dos diferentes extratos antigênicos parasitários, utilizados nos ensaios.

Alguns trabalhos têm mostrado que IgE circulante tem um importante papel na resposta imune contra helmintos (MEEUSEN; BALIC, 2000), apesar de ser encontrada em baixa concentração. Assim a presença de IgG em concentrações elevadas pode competir com sítios específicos de ligação da IgE, subestimando a quantificação através do ELISA (RIHET et al., 1992). Neste estudo foi demonstrado que 20% dos soros de pacientes com parasitológico positivo para *S. stercoralis* foram negativos no ELISA, para detecção de IgE específica. Estes resultados falso-negativos possivelmente são devido as elevadas concentrações de IgG, que competem com os sítios de ligação da IgE. Buscando elevar a sensibilidade do ensaio, os soros falso-negativos foram depletados de IgG, o que demonstrou uma elevação da reatividade de 45% (7/20) para 75% (15/20), confirmando dados da literatura (MAMONI et al., 2001). Os soros que permaneceram como falso-negativos, podem ainda conter níveis de IgG, que não foram totalmente depletados com uma única absorção, ou ainda a depleção de IgG, eliminou IgE específica em forma de complexo com a IgG (SOUZA-ATTA et al., 1999; MAMONI et al., 2001).

Souza-Atta et al. (1999), demonstraram que a absorção de IgG dos soros de pacientes com leishmaniose visceral e esquistossomose reduziu o número de reatividade cruzada no ensaio para detecção de IgE específica. Por outro lado, os resultados aqui apresentados mostram que a depleção de IgG dos soros de pacientes com outras parasitoses elevou o número de reações cruzadas, concordando com dados previamente publicados sobre o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose (MAMONI et al., 2001). Estas diferenças

podem estar relacionadas a infecções não diagnosticadas ou uma maior exposição dos epitopos antigênicos reconhecidos pela IgE, após a absorção de IgG.

O ELISA para pesquisa de IgG e IgE anti-*S. stercoralis* pode ser utilizado no auxílio diagnóstico da estrogiloidíase, porém, não substitui o diagnóstico parasitológico. É recomendado em casos de pacientes de risco para a infecção, antes de terapia imunossupressora e em inquéritos epidemiológicos.

7. SUMÁRIO DE RESULTADOS

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1. A cultura em placas de agar (CPA) foi o método mais sensível para a detecção das larvas de *S. stercoralis*, quando comparada com o método de Baermann-Moraes e o de sedimentação espontânea.
2. O diagnóstico da estrogiloidíase pode ser realizado utilizando o padrão de migração das larvas nas CPAs, observando o tempo de incubação necessário para a visualização dos caminhos.
3. A sensibilidade dos métodos parasitológicos de Baermann-Moraes e da CPA, para a pesquisa de larvas de *S. stercoralis*, foi reduzida após o armazenamento das amostras de fezes a 4°C.
4. No ELISA para detecção de IgG a sensibilidade variou de 72 a 76%, não apresentando diferenças significativas quando o antígeno foi tratado com metaperiodato de sódio. A especificidade encontrada no ensaio com metaperiodato de sódio foi de 75,5% enquanto no ensaio sem a utilização de metaperiodato de sódio foi de 83,6 %.
5. O ELISA para pesquisa de IgE apresentou sensibilidade de 80%. Quando o antígeno foi tratado com metaperiodato de sódio decresceu para 74%. Não foi observada variações das especificidades entre os ensaios.
6. O número de reações cruzadas no ELISA para pesquisa de IgE utilizando antígeno sem tratamento com metaperiodato foi de 30%, enquanto no ensaio com tratamento foi de 46 %.
7. A depleção de IgG dos soros falso-negativos elevou a sensibilidade do ELISA para detecção de IgE. No entanto, também ocorreu elevação do número de reatividades cruzadas com os soros de pacientes com outras parasitoses intestinais.

8. CONCLUSÕES

A cultura em placa de agar (CPA) foi o método mais sensível para o diagnóstico da estrogiloidíase e através da observação do padrão de migração foi possível realizar a diferenciação entre as larvas de *S. stercoralis* e ancilostomídeos. O ELISA para a detecção de anticorpos circulantes reativo ao antígeno bruto de *S. stercoralis* reagiu com soros de pacientes com estrogiloidíase e com outras parasitoses intestinais, não havendo redução da reatividade cruzada quando o antígeno foi tratado com metaperiodato de sódio. A utilização de um grupo de antígenos imunodominantes específicos pode elevar a sensibilidade e especificidade do ensaio.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787-793, 1996.
- ABRESCIA, F. F. et al. Reemergence of strongyloidiasis, northern Italy. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 9, p. 1531-1533, 2009.
- ADDOLORATO, G. et al. Influence of alcohol on gastrointestinal motility: lactulose breath hydrogen testing in orocecal transit time in chronic alcoholics, social drinkers and teetotaler subjects. **Hepatogastroenterol**, v. 44, p. 1076-1081, 1997.
- ALARCÓN DE NOYA, B. et al. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. **Exp Parasitol**, v. 95, p.106-112, 2000.
- ALBUQUERQUE, C. F.; MARQUES, S. H.; CAMARGO, Z. P. Improvement of the specificity of an ELISA linked immunosorbent assay for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1944-1946, 2005.
- ARAKAKI, T. et al. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Jap J Trop Med Hyg**, v. 16, p. 11-17, 1988.
- _____. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **J Parasitol**, v. 76, p. 425-428, 1990.
- ASHFORD, R. W. et al. *Strongyloides fuelleborni* kellyi: infection and disease in Papua New Guinea. **Parasitol Today**, v. 8, n. 9, p. 314-318, 1992.
- ASKANAZY, U. A.; ZWECK, D. Invasion der *Anguillula intestinalis* in die Darmwand. **Centralb f Bakteriolog u Parasitenk.** I Abth., 1900 xxvii, 569, 1900.
- ATKINS, N. S.; LINDO, J. F.; LEE, M. G. Immunomodulatory effects of concurrent HTLV-I infection in strongyloidiasis. **J Acq Immun Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 18, p. 188-190, 1998.
- ATKINS, N. S. et al. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: Correlations with larval output. **Parasite Immunol**, v. 21, n. 10, p. 517-526, 1999.

- ATTA, A. M. et al. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 525-530, 2004.
- BAVAY, A. Sur l'anguillule intestinale (*Linguillula intestinalis*), nouveau ver n'ematode trouvé par le Dr. Normand chez les malades atteints de diarrhée de cochinchine. **Comp Rend Sci Biol**, v. 84, p. 266-268, 1876.
- BAEK, B. K. et al. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Vet Parasitol**, v. 113, p. 217-227, 2003.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol**, v. 7, p. 875-888, 2007.
- BENINCASA, C. C. et al. Hiper-infecção por *Strongyloides stercoralis*: relato de caso. **Rev. Bras Ter Intensiva**, v. 9, n. 1, p. 131-135, 2007.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brasil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 26, n. 5, p. 490-494, 2001.
- BRASITUS, T. A. et al. Intestinal strongyloidiasis. A case report and review of the literature. **Am J Gastroenterol**, v. 73, n. 1, p. 65-69, 1980.
- BURTON, D. R.; WOOF, J. M. Human antibody effector function. **Advances in Immunol**, v. 51, p.1-84, 1992.
- CAMPOS, D. M. B. *Strongyloides cebus* Darling, 1911. Confirmação de espécie. **Rev Patol Trop**, v. 14, p. 173-219, 1985.
- CAMPOS, D. M. B.; FERREIRA, M. S. Estrongiloidíase. In. CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 293-303, 2005.
- CARA, D. C.; NEGRAO-CORREA, D.; TEIXEIRA, M. M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. **Histol Histopathol**, v.15, p.899-920, 2000.
- CARVALHO, E. M.; PORTO, A. F. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunol**, v. 26, p. 487-497, 2004.

CARVALHO FILHO, E. Strongyloidiasis. **Clinics Gastroenterol**, v. 7, n. 1, p. 179-200, 1978.

CELEDON, J. C. et al. Systemic strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of 3 cases and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v. 73, p. 256–263, 1994.

CHACÍN-BONILLA, L. Systemic strongyloidiasis. Review. **Invest Clin**, v. 32, n. 3, p. 131-145, 1991.

CHAI, J. Y.; HONGVANTHONG, B. A small-scale survey of intestinal helminthic infections among the residents near Pakse, Laos. **Korean J Parasitol**, v. 36, p. 55-58, 1998.

CHAN, M. S. et al. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. **Parasitology**, v. 109, p. 373-387, 1994.

CHEBLI, J. M. F. et al. Would azathioprine in inflammatory bowel disease be a risk factor for *Strongyloides stercoralis* infection? **Rev Juiz de Fora**, v. 32, n. 2, p. 33-35, 2006.

CHIEFFI, P. P. et al. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in São Paulo City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 711-712, 2000.

CHOUDHRY, M. A. et al. Impaired intestinal immunity and barrier function: A cause for enhanced bacterial translocation in alcohol intoxication and burn injury. **Alcohol**, v. 33, p. 199-208, 2004.

CHOUDHRY, M. A.; LI, X.; CHAUDRY, I. H. A role for corticosterone in impaired intestinal immunity and barrier function in a rodent model of acute alcohol intoxication and burn injury. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 1, p. 428-434, 2006.

CHU, Y. T.; CHIOU, S. S. Painless massive ascites and hypoalbuminemia as the major manifestations of systemic lupus erythematosus. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 39, n. 1, p. 78-81, 2006.

CHUNG, Y. B.; KONG, Y.; YANG, H. J. Enzymatic N-glycan analysis of 31 kDa molecule in plerocercoid of *Spirometra mansoni* (sparganum) and its antigenicity after chemical oxidation. **Korean J Parasitol**, v. 42, n. 2, p. 57-60, 2004.

CIMERMAN, S. et al. Perfil de enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo vírus HIV na terapia antiretroviral potente em um centro de referencia em São Paulo, Brasil. **Parasitol Latinoam**, v. 57, p. 111-119, 2002.

_____. Hiperinfection *Strongyloides stercoralis* in Aids patient. **Rev Panam Infectol**, v. 8, n. 2, p. 32-34, 2006.

CIRIONI, O. et al. *Strongyloides stercoralis* first-stage larvae in the lungs of a patient with AIDS: primary localization or a noninvasive form of dissemination? **Clin Infect Dis**, v. 22, p. 737, 1996.

CONCHA, R.; HARRINGTON, W. J.; ROGERS, A. I. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. **J Clin Gastroenterol**, v. 39, n. 3, p. 203-211, 2005.

CONWAY, D. J. et al. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, p. 173-176, 1993.

COSTA-CRUZ, J. M. et al. Detecção de IgG pelo teste ELISA, utilizando extratos antigênicos salino e alcalino de *Strongyloides ratti*, no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas**, v.16, p. 129, 1999.

_____. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 5, p. 265-268, 2003.

DE BONA, S.; BASSO, R. M. C. Hyperinfection by *Strongyloides stercoralis* associated with chronic use of corticosteroid. **Rev bras anal clin**, v. 40, n. 4, p. 247-250, 2008.

DE KAMINSKY, R. G. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **J Parasitol**, v. 79, n. 2, p. 277-280, 1993.

DE PAULA, F. M. et al. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop de São Paulo**, v. 42, n. 1, p. 51-55, 2000.

DEVAULT, G. A. et al. Opportunistic infections with *Strongyloides stercoralis* in renal transplantation. **Rev Infect Dis**, v. 12, n. 4, p. 653-671, 1990.

DOS SANTOS NETO, J. Movement of the rhabditiform larva of *Strongyloides stercoralis*. **Lancet**, v. 342, p. 1310, 1993.

DOS SANTOS, K. R. et al. Morphological and molecular characterization of *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae). **J Helminthol**, v. 84, n. 2, p. 136-142, 2010.

DREYER, G. et al. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 2569-2571, 1996.

DUTCHER, J. P. et al. Disseminated strongyloidiasis with central nervous system involvement diagnosed antemortem in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitts lymphoma. **Cancer**, v. 66, n. 11, p. 2417-2420, 1990.

FEITOSA, G. et al. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 5, p. 339-344, 2001.

FERREIRA, C. M. et al. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 9, n. 7, p. 813-820, 2007.

FINKELMAN, F. D. et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. **Ann Rev Immunol**, v. 15, p. 505-533, 1997.

FONSECA, E. O. L. et al. Prevalence and factors associated with geohelminth infections in children living in municipalities with low HDI in North and Northeast Brazil. **Cad de Saúde Pública**, v. 26, p.143-152, 2010.

GABURRI, D. A. K. et al. Intestinal parasitosis and hepatic cirrhosis. **Arq Gastroenterologia**, v. 34, p. 7-12, 1997.

GBAKIMA, A. A.; SAHR, F. Intestinal parasitic infections among rural farming communities in eastern Sierra Leone. **Afr J Med Med Sci**, v. 24, p. 195-200, 1995.

GENTA, R. M. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. **Parasitol Today**, v. 2, n. 9, p. 241-246, 1986.

_____. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Am J Clin Pathol**, v. 89, p. 391-394, 1988.

_____. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Rev Infect Dis**, v. 11, n. 5, p. 755-767, 1989.

_____. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, n. 4, p. 345-355, 1992.

_____. *Strongyloides stercoralis*. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN, J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. Infections of the gastrointestinal tract. **New York: Raven Press**, p. 1197-1207, 1995.

GORDON, S. M. et al. A Disseminated strongyloidiasis with cutaneous manifestations in an immunocompromised host. **J Am Acad Dermatol**, v. 31, p. 255-259, 1994.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. et al. Prospective study of strongyloidosis in patients with hematologic malignancies. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, n. 5, p. 355-357, 1997.

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Adv Parasitol**, v. 38, p. 251-309, 1996.

HARADA, U.; MORI, O. A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Med**, v. 1, p. 177-179, 1955.

HAYASHI, J. et al. Correlation between human T cell lymphotropic virus type-1 and *Strongyloides stercoralis* infections and serum immunoglobulin E responses in residents of Okinawa, Japan. **Am J Trop Med Hygiene**, v. 56, p.71-75, 1997.

HIRATA, T. et al. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, p. 683-684, 2007.

HO, P. L. et al. Two cases of fatal strongyloidiasis in Hong Kong. **Pathology**, v. 29, p. 324-326, 1997.

HUAMAN, M. C. et al. Gelatin particle indirect agglutination and enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis using *Strongyloides venezuelensis* antigen. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 97, p. 535-538, 2003.

HURTADO-GUERRERO, A. F.; ALENCAR, F. H.; HURTADO-GUERRERO, J. C. Ocorrência de enteroparasitas na população geronte de Nova Olinda do Norte – Amazonas, Brasil. **Acta Amaz**, v. 35, n. 4, p. 487-490, 2005.

HUSNI, R. N. et al. Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection in an immunocompetent patient. **Clin Infect Dis**, v. 23, p. 663, 1996.

INTAPAN, P. M. et al. Comparison of the quantitative formalin ethyl acetate concentration technique and agar plate culture for diagnosis of human strongyloidiasis. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p.1932-1933, 2005.

JARDIM-BOTELHO, A. et al. Hookworm, *Ascaris lumbricoides* infection and polyparasitism associated with poor cognitive performance in Brazilian schoolchildren. **Trop Med Int Health**, v. 13, p. 994-1004, 2008.

JEFFERIS, R.; LUND, J.; GOODALL, M. Recognition sites on human IgG for Fcγ receptors - the role of glycosylation. **Immunol Lett**, v. 44, p.111-117, 1995.

JOHNSTON, F. H. et al. Strongyloidiasis: A review of the evidence for Australian practitioners. **Aust J Rural Health**, v. 13, p. 247-254, 2005.

JONGWUTIWES, S. et al. Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 93, n. 4, p. 398-400, 1999.

KÁROLYI, Z. et al. Cutaneous manifestations of strongyloidosis. **Orv Hetil**, v. 140, n. 4, p. 191-194, 1999.

KARUNAJEEWA, H. et al. Parasite-specific IgG response and peripheral blood eosinophil count following albendazole treatment for presumed chronic strongyloidiasis. **J Travel Med**, v. 13, p. 84-91, 2006.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 1, p. 208-217, 2004.

KNOPP, S. et al. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p. 331, 2008.

KOBAYASHI, J. et al. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 37, p. 13-18, 1995.

_____. Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the agar plate faecal culture method. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 38, n. 4, p. 279-284, 1996.

KOGA, K. et al. An evaluation of the agar plate method for the detection of *Strongyloides stercoralis* in northern Thailand. **J Trop Med Hyg**, v. 93, p. 183-188, 1990.

_____. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 45, p. 518-521, 1991.

KOGA, K.; KASUYA, S.; OHTOMO, H. How effective is the agar plate method for *Strongyloides stercoralis*? **J Parasitol**, v. 78, p. 155-156, 1992.

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M. B. Evaluation of Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of strongyloidosis. **Pak J Med Sci**, v. 20, p. 36-40, 2004.

KOTHBARY, N. N.; MUSKIE, J. M.; MATBUR, S. C. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **Residents' teaching files**, v. 19, p. 1077-1081, 1999.

KOUGUCHI, H. et al. *Echinococcus multilocularis*: Purification and characterization of glycoprotein antigens with serodiagnostic potential for canine infection . **Exp Parasitol**, v. 128, n. 1, p. 50-56, 2011.

KROLEWIECKI, A. J. et al. Effect of chronic ethanol consumption on protective T-helper 1 and T-helper 2 immune responses against the parasites *Leishmania major* and *Strongyloides stercoralis* in mice. **Alcohol Clin Exp**, v. 25, p. 571-578, 2001.

LAI, C. P. et al. *Strongyloides stercoralis* infection with bloody pericardial effusion in a non-immunosuppressed patient. **Circ J**, v. 66, p. 613-614, 2002.

LAM, C. S. et al. Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 25, n. 1, p. 14-18, 2006.

LÁSZLÓ, F. A. et al. Vasopressin pressor receptor-mediated activation of HPA axis by acute ethanol stress in rats. **Am J Physiol: Regul, Integ Comp Physiol**, v. 280, p. 458-465, 2001.

LEMOS, L. B. et al. Hyperinfection syndrome in strongyloidiasis: report of two cases. **Ann Diagn Pathol**, v. 7, n. 2, p. 87-94, 2003.

LEORATTI, F. M. S. Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2004.

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

LIN, A. L. et al. Restrictive pulmonary disease due to interlobular septal fibrosis associated with disseminated infection by *Strongyloides stercoralis*. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, n. 1, p. 205-209, 1995.

- LINDO, J. F. et al. Parasite-specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 90, p. 702-703, 1996.
- LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 7, n. 3, p. 655-682, 1993.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCAS, S. B. Missing infections in AIDS. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 84, p. 34-38, 1990.
- LUDWIG, K. M. et al. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Rev soc bras Med Trop**, p. 548, 1999.
- LUZ, R. Investigações helmintológicas com aplicação al pathologia Brasileira. **Summary in Arch mbd nay**, p. 462, 1880.
- MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 161-164, 1998.
- MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.
- MACHADO, E. R. et al. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scand J Infect Dis**, v. 40, n. 2, p. 154-158, 2008.
- MACHADO, E. R.; FREITAS, C. V.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in individuals of rural area of Uberlandia, Minas Gerais State, Brazil. **Rev Patol Trop**, v. 39, p. 115-122, 2010.
- MAIA, T. M. C. et al. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*. **Rev Bras Promoção da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 118-121, 2006.
- MAIZELS, R. M. et al. Immunological modulations and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature**, v. 365, p. 797-805, 1993.

_____. Helminth parasites – masters of regulation. **Immunol**, v. 201, p.89-116, 2004.

MAMONI, R. L. et al. Capture Enzyme - linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, p. 237-241, 2001.

MARCHI BLATT, J.; CANTOS, G. Evaluation of techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative individuals in the city of Itajaí, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 7, p. 402-408, 2003.

MARQUES, S. M.; BANDEIRA, C.; QUADROS, R. M. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. **Parasitol Latinoam**, v. 60, n. 1-2, p. 78-81, 2005.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Exp Parasitol**, v. 85, p. 10-15, 1997.

MARUYAMA, H.; NAWA, Y.; OHTA, N. *Strongyloides venezuelensis*: binding of orally secreted adhesion substances to sulfated carbohydrates. **Exp Parasitol**, v. 89, p. 16-20, 1998.

MARUYAMA, H. et al. *Strongyloides venezuelensis*: heparin-binding adhesion substances in immunologically damaged adult worms. **Exp Parasitol**, v. 95, p. 170-175, 2000.

_____. Secreted adhesion molecules of *Strongyloides venezuelensis* are produced by oesophageal glands and are components of the wall of tunnels constructed by adult worms in the host intestinal mucosa. **Parasitology**, v. 126, p. 165-171, 2003.

_____. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 132, n. 13, p. 1-8, 2006.

MATOS, A. Prevalence of strongyloidiasis in ten municipalities of the Amazon State, Brazil, and its relation with soil and water physical chemical composition. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 1, p. 107-108, 2000.

MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A. Do Eosinophilis have a Role in the Killing of Helminth Parasites? **Parasitol Today**, v. 16, n. 3, p. 95-101, 2000.

MINÉ, J. C. Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassall, 1902 (rhabditida, strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara – SP. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, 2009.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 1, p. 507-624, 1948.

MOTA-FERZREIRA, D. M. et al. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis, **Acta Trop**, v. 109, n. 2, p. 103-107, 2009.

MUCK, A. E.; PIRES, M.; LAMMIE, P. J. Influence of infection with non-filarialhelminths on the specificity of serological assays for antifilarial immunoglobulin G4. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 97, p. 88-90, 2003.

NEVA, F. A.; GAM, A. A.; BURKE, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. **J Infect Dis**, v. 144, p. 427-432, 1981.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, p. 455-464, 2005.

NEWBERRY, A. M.; WILLIAMS, D. N.; STAUFFER, W. M. *Strongyloides* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and gram-negative sepsis. **Chest**, v. 128, p. 3681-3684, 2005.

NIELSEN, P. B.; MOJON, M. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* by seven consecutive stool specimens. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg**, v. 263, p. 616-618, 1987.

OBREGON-HENAO, A. et al. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. **Mol Biochem Parasitol**, v. 114, p. 209-215, 2001.

OGILVIE, K. et al. Mechanisms mediating the influence of alcohol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune and nonimmune signals. **Alcohol Clin Exp Research**, v. 22, p. 243-247, 1998.

OLIVEIRA, L. C. et al. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 119-121, 2002.

OLSEN, A. et al. Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 103, p. 967-972, 2009.

PINLAOR, S. et al. Detection of opportunistic and non-opportunistic intestinal parasites and liver flukes in HIV-positive and HIV-negative subjects. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 36, p. 841-845, 2005.

PORTO, A. F. et al. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunol**, v. 23, n. 9, p. 503-507, 2001.

PORTO, M. A. et al. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 641-649, 2002.

RAMANATHAN, R. et al. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **J Infect Dis**, v. 198, p. 444-451, 2008.

RAVI, V. et al. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Mol Biochem Parasitol**, v. 125, n. 1-2, p. 73-81, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIHET, P. et al. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **Eur J Immunol**, v. 22, p. 2063-2270, 1992.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bull U S Army Med Dept**, v. 8, n. 4, p. 326, 1948.

RODRIGUES, H. O.; VICENTE, J. J.; GOMES, D. C. *Strongyloides ferreirai* sp. n. (Nematoda, Rhabdiosoidea) parasito do roedor *Kerodon rupestris* (Wied.) no Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 4, p. 407-410, 1985.

ROMÁN-SÁNCHEZ, P. et al. Endemic strongyloidiasis on the Spanish Mediterranean coast. **QJM**, v. 94, p. 357-363, 2001.

RONAN, S. G. et al. Disseminated strongyloidiasis presenting as purpura. **J Am Acad Dermatol**, v. 21, p. 1123-1125, 1989.

SALAZAR, S.; GUTIERREZ, C.; BERK, S. Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 23, p. 141-145, 1995.

SANDGROUND, J. H. Speciation and specificity in the Nematoda genus *Strongyloides*. **J Parasitol**, v. 12, p. 59-82, 1925.

SANTOS, L. P.; SANTOS, F. L. P.; SOARES, N. M. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no hospital universitário professor Edgar Santos, Salvador-Bahia. **Rev Patol Trop**, v. 36, p. 237-246, 2007.

SARMIENTO, L.; TANTALEÁN, M.; HUIZA, A. Nemátodos parásitos del hombre y de los animales en el Perú. **Rev Peru Parasitol**, v. 14, p. 9-65, 1999.

SATO, Y. et al. Detection of antibodies in strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 79, n. 1, p. 51-55, 1985.

_____. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 84, n. 3, p. 403-406, 1990.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 37, n. 1, p. 35-41, 1995a.

SATO, Y. et al. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, p. 248-250, 1995b.

SCHAFFEL, R. et al. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 4, p. 346-350, 2001.

SCHALLIG, H. D.; VAN LEEUWEN, M. A. Carbohydrate epitopes on *Haemonchus contortus* antigens. **Parasitol Res**, v. 82, p. 38-42, 1996.

SHIWAKU, K. et al. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v. 97, p. 129-138, 1988.

SHOOP, W. L. et al. Transmammary transmission of *Strongyloides stercoralis* in dogs. **J Parasitol**, v. 88, n. 3, p. 536-539, 2002.

SIDDIQUI, A. A.; BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 7, p. 1040-1047, 2001.

SILVA, L. P. et al. Western Blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 687-691, 2003.

SILVA, C. V. et al. Intestinal parasitic infections in HIV/Aids patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scand J Infect Dis**, v. 37, p. 211-215, 2005.

SOUZA-ATTA, M. B. L. et al. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, p.1101-1105, 1999.

SOROZCAN, W. *Strongyloides stercoralis* intestinal roundworm. II. Geographic distribution. **Wiad Parazytol**, v. 40, p. 115-126, 1994.

SPEARE, R. Identification of species of *Strongyloides*. In: Grove, D. I. **Strongyloidiasis: a major roundworm infection of man**. London: Taylor & Francis, p. 11-83, 1989.

SUAREZ, A. F.; CERRILLO SÁNCHEZ, G. *Strongyloides stercoralis*: histopathological findings of duodenal mucosa. **Rev gastroenterol Perú**, v. 26, n. 1, p. 44-48, 2006.

SUDARSHI, S. et al. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travellers compared with immigrants in a non-endemic country. **Trop Med Int Health**, v. 8, p. 728-732, 2003.

SUDRÉ, A. P. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Rev Pat Trop Goiana**, v. 35, n. 3, p. 173-184, 2006.

SUDRÉ, A. et al. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitol Res**, v. 101, n. 4, p. 1117-1123, 2007.

TAKAMURE, A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int J Parasitol**, v. 25, n. 8, p. 907-911, 1995.

TANTON, D. D.; DURNING, S.; CHAMBERS, S. Pulmonary hyperinfection with *Strongyloides stercoralis* in an immunocompetent patient. **J Gen Intern Med**, v. 17, p. 72-73, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; GRANDINI, A. A. Prevalence and epidemiological aspects of parasitic infestation in the population of São José da Bela Vista, São Paulo State, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 63-65, 1999.

TAWEETHAVONSAWAT, P. et al. Specific monoclonal antibodies to *Strongyloides stercoralis*: a potential diagnostic reagent for strongyloidiasis. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 20, n. 4, p. 247-256, 2002.

TEIXEIRA, A. T. *Strongyloides stercoralis*: frequência em exames parasitológicos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e análise morfométrica das larvas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, p. 75-76, 1997.

TEIXEIRA, M. C. et al. Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia. **J Parasitol**, v. 96, p. 833-835, 2010.

THOMAS, M. C.; COSTELLO, S. A. Disseminated strongyloidiasis arising from a single dose of dexamethasone before stereotactic radiosurgery. **Int J Clin Pract**, v. 52, p. 520-521, 1998.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, p. 967-973, 1999.

VALLADA, E. P. **Manual de Exames de Fezes – Coprologia e Parasitologia**, São Paulo: Atheneu, 1993.

VANDEBOSCH, S. et al. *Strongyloides stercoralis* infection associated with repetitive bacterial meningitis and SIADH: a case report. **Acta Gastroenterol Belg**, v. 71, n. 4, p. 413-417, 2008.

VAN DOORN, H. R. et al. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 438-442, 2007.

VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clin Mol Allergy**, v. 4, p. 8, 2006.

VARATHARAJALU, R. et al. *Strongyloides stercoralis* excretory/secretory protein strongylastacin specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 2, p. 115-122, 2011.

VAZ, A. J. Diagnóstico imunológico das parasitoses. In: DE CARLI, A. G. **Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 505-539, 2001.

VELOSO, M. G. et al. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: autopsy case report. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 413-415, 2008.

VERVELDE, L.; BAKKER, N.; KOOYMAN, F. N. J. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. **Glycobiology**, v. 13, p. 795-804, 2003.

VERWEIJ, J. J. et al. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 4, p. 342-346, 2009.

WEGENER, M. et al. Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. **Dig Dis Sci**, v. 36, p. 917-923, 1991.

World Health Organization. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). WHO/CDC case definition for AIDS. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 61, p. 69-73, 1986.

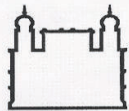
WURTZ, R. et al. Short report: gastric infection by *Strongyloides stercoralis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 51, p. 339-340, 1994

YORI, P. P. et al. Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon, **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, p. 97-102, 2006.

ZHENG, W. J. et al. Protein-losing enteropathy in systemic lupus erythematosus: analysis of the clinical features of fifteen patients. **J Clin Rheumatol**, v. 13, n. 6, p. 313-316, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 102/2006

Protocolo: 203

Projeto de Pesquisa: Desenvolvimento e Implantação de Métodos Parasitológicos e Imunológicos para o Diagnóstico da Estrongiloidíase

Pesquisador Responsável: Dra. Neci Matos Soares

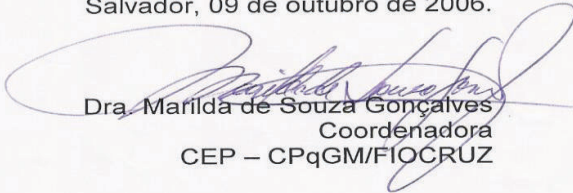
Instituição ou Departamento : Laboratório de Parasitologia- Faculdade de Farmácia (UFBA)

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 09 de outubro de 2006.


Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Coordenadora
CEP – CPqGM/FIOCRUZ

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**(Obrigatório para Pesquisa Científica em Seres Humanos – Resolução nº 01 de 13.6.1988 – CNS)****Instituição:** Laboratório de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Avenida Barão de Geremoabo, Campus Universitário de Ondina, s/n. Ondina, Salvador-BA.**Projeto:** Desenvolvimento e implantação de métodos parasitológicos e imunológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase**Pesquisadores responsáveis:**

Neci Matos Soares

O Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia está realizando uma pesquisa para melhorar os métodos de diagnóstico de uma parasitose intestinal, chamada estrogiloidíase. Esta doença é transmitida por um verme que pode causar problemas gastrointestinais e respiratórios, mas também, pode não causar nenhuma doença.

Este estudo pode contribuir para melhorar a saúde da população a sua participação não traz nenhum prejuízo ou risco para a sua pessoa, uma vez que as amostras utilizadas na pesquisa são as mesmas solicitadas pelo seu médico, para a realização dos seus exames. Se o Sr (a) concordar em participar deste estudo serão utilizada as suas fezes e o seu soro. A sua participação poderá trazer benefícios imediatos ao seu problema, auxiliando no seu tratamento, pois os resultados dos testes serão encaminhados para o médico ou ao próprio paciente.

O Sr (a) poderá recusar-se a participar do estudo agora, ou em qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer constrangimento ou penalidade da instituição que está realizando esta pesquisa. Sua identidade será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa conterà o seu nome.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto estarão à disposição para esclarecer qualquer dúvida ou questão que o Sr (a) tenha em relação a este estudo.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas que garantiu sua aprovação quanto ao conteúdo ético deste trabalho.

Declaro que li este consentimento e que de livre e espontânea vontade, concordei em participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura: _____

Salvador (BA), _____