Maiara Gottardi

**Imunodiagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis*
em pacientes candidatos a transplante**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges
Gryschek

São Paulo

2014

Maiara Gottardi

**Imunodiagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis*
em pacientes candidatos a transplante**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges
Gryschek

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gottardi, Maiara

Imunodiagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis* em pacientes candidatos a transplante / Maiara Gottardi. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryscek.

Descritores: 1.Estrongiloidíase 2.*Strongyloides stercoralis* 3.Testes imunológicos
4.Técnica indireta de fluorescência para anticorpo 5.Ensaio de imunoadsorção
enzimática 6.Western Blotting

USP/FM/DBD-254/14

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes que contribuíram para esse trabalho de mestrado.

À toda minha família pela paciência e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido força e fé para realização desse trabalho de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek, pela oportunidade, confiança e orientação.

À Dra. Fabiana Martins de Paula por toda ajuda, ensinamentos laboratoriais e orientação.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, à Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e a Profa. Guita Rubinsky Elefant, pelas instruções concedidas no exame de qualificação.

À Dra. Dirce Mary Correia Lima por contribuir com sua experiência técnica laboratorial e por ser uma grande amiga, ajudando em todos os aspectos emocionais.

Ao MSc. Marcelo Corral, amigo e companheiro de todas as fases do mestrado e vida pessoal. Muito obrigada pela força e amizade nos momentos mais alegres e nos mais difíceis!

A todos os amigos que conheci nessa jornada e que de alguma forma fizeram a diferença: Ariana Carolina Ferreira, Bruna Talita Arjol, Camilla Grans, Caroline Furtado Noble, Gabriela Rodrigues e Fonseca, Gessica Baptista de Melo, João Paulo Moreira, Juvisan Aguedo Ariza, Livia Botelho Lima, Pablo Espinosa Gill, Priscilla Duarte Marques, Renata Mendes, Tatiane Assoni dos Santos, Wanderli Soares Ramos de Carvalho, William Roldan e Yeda Midori.

A todos os funcionários do Laboratório de imunopatologia da esquistossomose e outras parasitoses (LIM-06) que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho: Ana Maria Gonçalves da Silva, Prof. Dr. Antonio Sesso, MSc. Clarice Lemos, Cristina Conceição Melo, Francisca de Fátima Valentim, MSc. Maria Cristina Nakle, Dra. Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo, Miriam Del Corço Alves Sanches e Dra. Susana Zevallos.

À Roseli Antonia Santo, mais que uma secretária, uma amiga que ajudou muito nas informações em todos os momentos do mestrado! Muito Obrigada!

À toda minha família por serem a base de tudo, especialmente minha mãe, Maria Leonor Gottardi, que sempre concedeu todo tipo de apoio para que eu conseguisse chegar até aqui. Muito obrigada por tudo! Você é tudo para mim. Agradeço também minha tia Marilda Rebelo Gottardi e meu tio Alcestes dos Santos Rebelo Jr., pelo apoio, carinho e proteção. Agradeço minha avó Hilda Marques Gottardi pelo carinho e amor de sempre.

Ao meu namorado Pedro Amstalden, pelo carinho, compreensão e força nos momentos mais difíceis, sua ajuda foi fundamental em todos esses anos! Obrigada!

A FAPESP, Capes e CNPq pelo auxílio a pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma nessa experiência acadêmica, muito obrigada!

“Tudo no mundo começou com um sim. Uma molécula disse sim a outra molécula e nasceu a vida. “

Clarice Lispector

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA.....	4
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo Geral	7
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4 REVISÃO DA LITERATURA	8
4.1 Aspectos históricos e taxonômicos	9
4.2 Epidemiologia	10
4.3 Aspectos biológicos	11
4.4 Ciclo biológico.....	13
4.5 Imunologia	16
4.6 Aspectos clínicos	20
4.7 Diagnóstico	21
4.7.1 Parasitológico	22
4.7.2 Sorológico.....	23

4.7.3 Métodos moleculares	25
4.8 A estrogiloidíase e transplantes de órgãos.....	26
5 MÉTODOS.....	29
5.1 Aspectos Éticos	30
5.1.1 Experimentação animal	30
5.1.2 Pesquisa com seres humanos.....	30
5.2 População de estudo	31
5.2.1 Pacientes para validação dos testes.....	31
5.2.2 Pacientes candidatos a transplante	32
5.3 Métodos Parasitológicos	33
5.3.1 Sedimentação Espontânea (Lutz, 1919)	33
5.3.2 Técnica de Rugai (Rugai et al., 1954)	34
5.3.3 Cultura em placa de ágar (Arakaki et al., 1990; Koga et al., 1991)	34
5.4 Preparação dos antígenos	35
5.4.1 Obtenção das larvas filarioides (L3)	35
5.4.2 Extrato alcalino	35
5.4.3 Extrato salino	36
5.4.4 Cortes de larvas	36
5.5. Testes Sorológicos.....	37
5.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	37
5.5.2 Teste Imunoenzimático (ELISA).....	38

5.5.3 Western-Blotting (WB)	39
5.6 Análise Estatística.....	41
5.7 Normas de Biossegurança	42
6 RESULTADOS.....	43
6.1 Dados sociodemográficos e clínicos	44
6.2 Teste diagnóstico não específico	45
6.3 Diagnóstico parasitológico	46
6.4 Caracterização dos antígenos.....	47
6.5 Diagnóstico sorológico	48
6.5.1 Validação das técnicas sorológicas	48
6.5.1.1 RIFI	48
6.5.1.2 ELISA	50
6.5.1.3 Western-Blotting	52
6.5.2 Aplicação das técnicas sorológicas nos pacientes candidatos a transplante	55
6.5.2.1 RIFI	55
6.5.2.2 ELISA	58
6.5.2.3 WB	60
6.5.3. Comparação de técnicas.....	65
7 DISCUSSÃO.....	68
8 CONCLUSÕES.....	78

9 ANEXOS	80
Anexo I	81
Anexo II	83
10 REFERÊNCIAS	84
11 APÊNDICES	99
Apêndice I	100
Apêndice II	103
Apêndice III	104
Apêndice IV	105
Apêndice V	106
Apêndice VI	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis* (Adaptado de CDC, 2014. www.dpd.cdc.gov). (1) Larvas rabditoide eliminadas pelas fezes; (2) Desenvolvimento de adultos de vida livre; (3) Ovos são produzidos por fêmeas de vida livre; (4) Desenvolvimento de larva rabditoide a partir de ovos embrionados; (5) Transformação da larva rabditoide em filarioide; (6) Penetração da filarioide na pele; (7) Larva filarioide é carregada pelo sistema circulatório e pulmões, ocorre a migração da larva para a faringe, as larvas deglutidas chegam ao intestino transformando-as em fêmeas partenogênicas; (8) Fêmeas adultas no intestino; (9) Os ovos são depositados na luz intestinal e as larvas migram para luz intestinal..... 15
- Figura 2.** Dois cenários são considerados: no trato gastrointestinal, estão envolvidas imunidade inata e adaptativa. Os mecanismos efetores inatos incluem células globosas, as quais aumentam a produção de muco, alteram o tipo de muco e liberam a proteína efetora molécula- β resistina-símile (RELM- α); mastócitos e, alternativamente, macrófagos ativados, estimulados por citocinas da resposta Th2 e nuócitos (célula inata linfoide). Em diversos tecidos, larvas de helmintos que penetram pela pele podem ser interceptadas por eosinófilos dependentes de IL-5. Em órgãos internos, múltiplas populações de granulócitos e macrófagos são estimuladas por quimiocinas, citocinas e anticorpos para agredir o helminto via ação de mediadores pré-formados e metabólitos reativos (adaptado de Taylor et al., 2012)..... 17

Figura 3.	SDS-PAGE 12% indicando perfil eletroforético dos extratos antigênicos (alcalino, 2 e salino, 3), obtidos de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> . Padrão de massa molecular (1) de 150–15 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).....	47
Figura 4.	Cortes de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> (4μ), em aumento de 20X. (A) – Amostras de soro positivo (<i>grupo i</i> , A), soro negativo (<i>grupo ii</i> , B), soros positivos (<i>grupo iii</i>) para ancilostomídeo (C) e positivo para <i>S. mansoni</i> (D).....	49
Figura 5.	Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro dos indivíduos com estrongiloidíase (<i>grupo i</i> (●)), negativos (<i>grupo ii</i> (•)) e com outras parasitoses (<i>grupo iii</i> (▲)) por ELISA utilizando os extratos alcalino (A) e salino (B) de <i>S. venezuelensis</i> . Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo.....	51
Figura 6.	Curva ROC, indicando o <i>cut-off</i> , a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) <i>likelihood ratio</i> segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando os extratos alcalino (D) e salino (E) de <i>S. venezuelensis</i> . A curva ROC foi calculada a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses.....	52
Figura 7.	Avaliação inicial do WB frente ao extrato salino de <i>S. venezuelensis</i> , utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 e 2, <i>grupo i</i>), negativo (3, <i>grupo ii</i>); e com ancilostomídeo (4, <i>grupo iii</i>). Os soros e anticorpo secundário foram diluídos 1:1000. MM – Padrão de massa molecular de 220–12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).....	53

- Figura 8.** WB frente ao extrato alcalino de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 4, grupo *i*); negativos (5 a 8, grupo *ii*); e com outras parasitoses (11 a 15, grupo *iii*). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) 54
- Figura 9.** WB frente ao extrato salino de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 4, grupo *i*); negativos (5 a 8, grupo *ii*); e com outras parasitoses (11 a 15, grupo *iii*). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)..... 54
- Figura 10.** Cortes de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (4 μ), em aumento de 20X. RIFI em pacientes candidatos a transplantes: soro renal positivo (A) e negativo (B), soro hepático positivo (C) e negativo (D), soro medula-óssea positivo (E) e negativo (F)..... 57
- Figura 11.** Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de pacientes candidatos a transplante renal (TR (●)), transplante hepático (TH (▪)) e transplante de medula-óssea (TMO (▲)) por ELISA utilizando o extrato alcalino de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo..... 59
- Figura 12.** Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de pacientes candidatos a transplante renal (TR (●)), transplante hepático (TH (▪)) e transplante de medula-óssea (TMO (▲)) por ELISA utilizando o extrato salino de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo..... 59

Figura 13.	Frequência de bandas imunodominantes reconhecidas pelos soros dos pacientes candidatos a transplante, utilizando o extrato alcalino de <i>S. venezuelensis</i>	62
Figura 14.	Frequência de bandas imunodominantes reconhecidas pelos soros dos pacientes candidatos a transplante, utilizando o extrato salino de <i>S. venezuelensis</i>	62
Figura 15.	WB frente ao extrato alcalino de <i>S. venezuelensis</i> , utilizando soros dos pacientes candidatos a transplante: renal reagentes (1 e 2) e não reagente (3); hepático reagentes (4 e 5), e não reagente (6); e medula-óssea (7 e 8) reagentes e não reagente (9). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).....	63
Figura 16.	WB frente ao extrato salino de <i>S. venezuelensis</i> , utilizando soros dos pacientes candidatos a transplante: renal reagentes (1 e 2) e não reagente (3); hepático reagentes (4 e 5), e não reagente (6); e medula-óssea (7 e 8) reagentes e não reagente (9). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sexo e idade dos pacientes ambulatoriais candidatos a transplantes, HCFMUSP, 2012.....	44
Tabela 2.	Valores de eosinófilos nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	45
Tabela 3.	Sexo e idade em relação a positividade para <i>S. stercoralis</i> , utilizando os métodos parasitológicos dos pacientes ambulatoriais candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	46
Tabela 4.	Detecção de <i>S. stercoralis</i> utilizando os métodos parasitológicos isolados e combinados nas 150 amostras de fezes de pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	47
Tabela 5.	Estimativa da acurácia diagnóstica da RIFI para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana.....	48
Tabela 6.	Parâmetros de diagnóstico na validação do teste ELISA em diferentes concentrações do soro dos indivíduos e do conjugado.....	50
Tabela 7.	Parâmetros de diagnóstico dos extratos alcalino e salino de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> pelo teste ELISA.....	52
Tabela 8.	Parâmetros de diagnóstico dos extratos alcalino e salino de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> pelo teste WB.....	55

Tabela 9.	Positividade da RIFI para a detecção de <i>S. stercoralis</i> nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	56
Tabela 10.	Distribuição dos títulos de anticorpos anti-IgG <i>Strongyloides</i> detectado pela RIFI utilizando como antígeno cortes de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> , nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	56
Tabela 11.	Positividade da técnica de ELISA utilizando extrato alcalino e salino de larvas de <i>S. venezuelensis</i> para a detecção de <i>S. stercoralis</i> nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	58
Tabela 12.	Positividade do WB, utilizando os extratos de <i>S. venezuelensis</i> , nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012...	60
Tabela 13.	Frequência de reatividade de bancas reconhecidas pelos soros de pacientes candidatos a transplantes, utilizando a técnica de WB com os extratos alcalino e salino de larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	61
Tabela 14.	Comparação das técnicas sorológicas RIFI, ELISA e WB para detecção de <i>S. stercoralis</i> nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	65
Tabela 15.	Comparação dos métodos parasitológicos e sorológicos (RIFI, ELISA e WB), para o diagnóstico de <i>S. stercoralis</i> nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.....	66
Tabela 16.	Correlação entre as técnicas parasitológicas e sorológicas nos pacientes candidatos a transplante renal, HCFMUSP, 2012.....	66

Tabela 17. Correlação entre as técnicas parasitológicas e sorológicas nos
pacientes candidatos a transplante hepático HCFMUSP, 2012.. 67

Tabela 18. Correlação entre as técnicas parasitológicas e sorológicas nos
pacientes candidatos a transplante de medula óssea,
HCFMUSP, 2012..... 67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg/mL	Microgramas por mililitros
µm	Micrômetros
<	Menor que
>	Maior que
κ	Índice Kappa
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AUC	Área sobre a curva
cm	centímetros
<i>Cut-off</i>	Frequência absoluta do corte
DO	Densidade óptica
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ES	Especificidade
<i>g</i>	Giros
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)

HTLV-I	Vírus T-linfotrópico humano tipo I
IE	Índice ELISA
IgG	Imunoglobulina G
IgG2	Imunoglobulina G da subclasse 2
IgG4	Imunoglobulina G da subclasse 4
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucinas
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
kDa	Kilodalton
L1	Larvas rabditoides de primeiro estágio
L2	Larvas rabditoides de segundo estágio
L3	Larvas filarioides
LR	<i>Likelihood ratio</i>
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligramas
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nM	Nanômetros
n	Número
N	Normal

°C	Graus Celsius
OPD	Orto-fenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos (<i>Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino + Tween 20
TM	Tampão de bloqueio (Tris-HCL 1M pH 7.5 5%, NaCl 5M 2% acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite desnatado em pó)
pH	Ponto hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Sensibilidade
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qPcr	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
TH	Transplante hepático
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i> (<i>Toll-like receptors</i>)

TMO	Transplante medula óssea
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Transplante renal
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
V	Volts
x	Vezez
WB	<i>Western-Blotting</i>

RESUMO

Gottardi M. Imunodiagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis* em pacientes candidatos a transplante. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A estrongiloidíase é uma infecção intestinal causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*. A maioria dos casos evolui para um quadro crônico benigno; entretanto pode haver hiperinfecção e disseminação, sobretudo em pacientes imunodeprimidos. Os métodos parasitológicos convencionais apresentam baixa sensibilidade e, com isso, os testes sorológicos podem representar uma boa alternativa para o diagnóstico dessa helmintíase. O presente trabalho tem como objetivo avaliar as técnicas de RIFI, ELISA e WB para o diagnóstico da estrongiloidíase em pacientes candidatos a transplante. Para validação dos testes, foram utilizadas amostras de soros de pacientes imunocompetentes (positivos para *S. stercoralis*, positivos para outras parasitoses e negativos). Foram utilizadas amostras de fezes e soros de pacientes candidatos a transplante, a saber: 50 para transplante renal; 50 para transplante de fígado; 50 para transplante de medula óssea. As amostras fecais de todos os pacientes foram analisadas pelas técnicas de sedimentação espontânea, Rugai, e cultura em placa de ágar. Para a execução das técnicas sorológicas foram utilizadas como fonte de antígeno larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Para a RIFI, os soros foram diluídos a 1:40 em tampão PBS-TM e o conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína diluído 1:500 em PBS acrescido de 4% de azul de Evans, sendo realizada a leitura em microscópio de imunofluorescência, utilizando as objetivas de 20X e 40X. Para a técnica ELISA foram utilizadas placas poliestireno sensibilizadas com 10µg de antígeno (frações solúveis salina e alcalina), soro dos indivíduos diluídos a 1:200 em PBS 0,05% Tween 3% de leite (PBS-TM) e conjugado (anti-IgG humana peroxidase) em PBS-TM. As amostras foram consideradas positivas quando o índice ELISA foi maior que 1. Para a técnica de WB, os soros foram diluídos 1:100 em Tris-HCl 5% de leite (TM) e o conjugado (anti IgG-humana peroxidase) em PBS-TM. Dos 150 pacientes candidatos a transplante analisados, 9,3% (n=14) foram positivos pelas técnicas parasitológicas, sendo que a cultura em placa de ágar detectou 6,6% (n=10). Na RIFI a soropositividade para detecção da infecção por *S. stercoralis* foi de 16,6% (n=25), sendo, 22% transplante renal, 18% hepático e 10% medula óssea. Pela técnica ELISA a soropositividade foi de 11,3% (n=17), sendo 14% nos pacientes candidatos a transplante renal, 14% hepático e 3% medula óssea, utilizando o antígeno alcalino, e 24,6% (n=37), sendo 18% nos pacientes candidatos a transplante renal, 50% hepático e 6% medula óssea, utilizando o antígeno salino. Pela técnica WB a soropositividade foi de 20,6% (n=31), sendo 18% nos pacientes candidatos a transplante renal, 32% hepático e 12% medula óssea, utilizando o antígeno alcalino, e 18,6% (n=28) sendo 10% nos pacientes candidatos a transplante renal, 14% hepático e 32% medula óssea, utilizando o antígeno salino. A utilização de técnicas imunodiagnósticas pode ser indicada na triagem de pacientes em fila de transplante, devendo-se levar em conta as limitações de reações sorológicas em pacientes imunodeprimidos.

Descritores: Estrongiloidíase; *Strongyloides stercoralis*; imunodiagnóstico; candidatos a transplante; Técnica indireta de fluorescência para anticorpo; Ensaio de imunoadsorção enzimática; Western blotting.

ABSTRACT

Gottardi M. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in patients eligible for transplantation. [Dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2014.

Strongyloidiasis is an intestinal infection caused by the nematode *Strongyloides stercoralis*. Most cases progress to a benign chronic condition; however hyperinfection and dissemination may occur, especially in immunocompromised patients. Conventional parasitological methods have low sensitivity and, thus, serological tests may be a good alternative for the diagnosis of this helminthiasis. The aim of this study was to evaluate RIFI, ELISA and WB techniques for the diagnosis of strongyloidiasis in patients candidates for transplants. In order to validate the tests samples of sera from immunocompetent patients (positive for *S. stercoralis*, positive for other parasitosis, and negatives) were used. Feces and sera samples of patients candidates for transplants were used as follows: 50 for renal transplant, 50 for liver transplant, 50 for bone marrow transplant. Fecal samples of all patients were analyzed by spontaneous sedimentation, Rugai and Agar plate culture techniques. Filarioid larvae of *S. venezuelensis* were used as source of antigen for serological tests. For RIFI, sera were diluted 1:40 in PBS-TM buffer and human anti-IgG conjugate labeled with fluorescein was diluted 1:500 in PBS with 4% Blue Evans, reading being performed in immunofluorescence microscope using 20X and 40X objectives. For ELISA technique polystyrene plates sensitized with 10µg of antigen (saline and alkaline soluble fractions), individual sera diluted at 1:200 in PBS 0.05% Tween 3% of milk (PBS-TM) and conjugate (human anti-IgG peroxidase) in PBS-TM were used. Samples were considered positive when ELISA index was higher than 1. For WB technique, sera were diluted in Tris-HCl 5% of milk (TM) and conjugate (human anti-IgG peroxidase) in PBS-TM. From 150 patients candidates for transplants analyzed 9.3% (n=14) were positive by parasitological techniques, agar plate culture detected 6.6% (n=10). In RIFI seropositivity for *S. stercoralis* infection detection was 16.6% (n=25) being 22% renal transplant, 18% hepatic and 10% for bone marrow. By ELISA technique seropositivity was 11.3% (n=17), being 14% in patients candidates for renal transplant, 14% hepatic and 3% bone marrow, using alkaline antigen and 24.6% (n=37), being 18% in patients candidates for renal transplant, 50% hepatic and 6% bone marrow, using saline antigen. By WB technique seropositivity was 20.6% (n=31), being 18% in patients candidates for renal transplant, 32% hepatic and 12% bone marrow, using alkaline antigen, and 18.6% (n=28) being 10% in patients candidates for renal transplant, 14% hepatic and 32% bone marrow, using saline antigen. Application of immunodiagnostic techniques could be indicated in screening of patients in transplant waiting list, however limitations of serological reactions in immunodepressed patients should be considered.

Descriptors: Strongyloidiasis; *Strongyloides stercoralis*; immunodiagnosis; transplant candidates; Indirect fluorescent antibody technique; Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Western blotting.

1 INTRODUÇÃO

A estrongiloidíase é uma infecção parasitária causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis*. Este parasito intestinal possui distribuição mundial, sendo particularmente prevalente em regiões tropicais e subtropicais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014), estima-se que entre 30 e 100 milhões de pessoas encontram-se infectadas no mundo (Genta; Lillibridge, 1989; Siddiqui; Berk, 2001; Requena-Méndez et al., 2013). Embora as informações sobre prevalência dessa helmintíase sejam fragmentadas, no Brasil há elevada endemicidade, havendo variação regional (Naves; Costa-Cruz, 2013).

Parasitos do gênero *Strongyloides* possuem a particularidade de realizar duplo ciclo evolutivo. As fêmeas partenogenéticas são as únicas que parasitam o intestino delgado do hospedeiro. A infecção deste ocorre através da penetração ativa de larvas filarioides infectantes na pele ou mucosa, ganhando a circulação sanguínea e sistema cardiopulmonar onde sofrerão mudas e se direcionarão para o intestino delgado (Grove, 1996; Sudré et al., 2006).

Na estrongiloidíase, alguns hospedeiros desenvolvem infecção assintomática e crônica, enquanto outros podem apresentar sintomas leves; há ainda, casos mais graves como a hiperinfecção e a doença disseminada. A multiplicidade de apresentações clínicas está relacionada à imunidade do hospedeiro. Assim, destacam-se como risco para desenvolver formas graves dessa parasitose o etilismo, o diabetes mellitus com cetoacidose, a infecção por HTLV, os transplantes de órgãos e a terapia com corticosteroides (Grove, 1996; Fardet et al., 2007).

O diagnóstico definitivo da estrongiloidíase baseia-se no exame parasitológico de fezes, o qual possui baixa sensibilidade, uma vez que a liberação de larvas nas fezes é intermitente, sendo necessárias, segundo alguns autores, sete amostras para aumentar a sensibilidade (Uparanukraw et al., 1999).

As técnicas imunológicas vêm sendo desenvolvidas para melhorar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnósticos desta helmintíase (Grove, 1996; Olsen et al., 2009). O diagnóstico sorológico, por meio da detecção de anticorpos contra antígenos larvários, parece promissor, embora não seja utilizado rotineiramente devido à dificuldade na obtenção de antígenos (Gryschek; Siciliano, 2005). Por isso tem-se empregado em laboratórios de pesquisa os antígenos heterólogos, provenientes de larvas de outras espécies de *Strongyloides*, sobretudo *S. venezuelensis* (Sato et al., 1995; Costa-Cruz et al., 2003; Machado et al., 2003; Silva et al., 2003; Rodrigues et al., 2004).

Os pacientes imunocomprometidos, em especial, os candidatos a transplantes, constituem um grupo especialmente preocupante, devido à possibilidade de desenvolverem a síndrome de hiperinfecção e doença disseminada (Chokkalingam Mani et al., 2013). Dessa forma, o diagnóstico e o tratamento da estrongiloidíase antes da terapia imunossupressora constituem importantes fatores para diminuir a probabilidade de progressão da doença para quadros graves e frequentemente fatais (Robxy et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A estrongiloidíase constitui um importante problema de saúde pública em muitas partes do mundo, sobretudo no contexto das imunodepressões, seja ocasionada por doenças autoimunes, neoplásicas ou infecciosas, seja pelo uso terapêutico de imunossupressores e, principalmente, de corticosteroides. A estrongiloidíase disseminada é uma condição que possui critérios diagnósticos pouco específicos e tratamentos com eficácia limitada, o que contribui para sua elevada mortalidade. Os principais desafios relacionados à estrongiloidíase disseminada atualmente, são aumentar a suspeição clínica, melhorar o desempenho de testes diagnósticos e administrar tratamentos mais eficazes.

A dificuldade de obtenção de amostras fecais tem sido um problema para diagnóstico parasitológico em função da quantidade insuficiente e da preservação da amostra para análise, o que pode comprometer os resultados.

Além dos problemas expostos acima, a demora na obtenção de resultados consistentes nos métodos parasitológicos, da possibilidade de pacientes provenientes de áreas endêmicas que serão submetidos a transplantes estarem infectados com *S. stercoralis*, e da real possibilidade de hiperinfecção e disseminação no pós-transplante, são extremamente oportunas a rapidez e precisão no diagnóstico desta helmintíase, para que o tratamento efetivo seja realizado precocemente.

A atenção no diagnóstico da estrongiloidíase em pacientes candidatos a transplantes é primordial. Diante disso, o presente estudo propõe a aplicação de métodos sorológicos para o diagnóstico da estrongiloidíase nesses pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar o imunodiagnóstico da estrogiloidíase utilizando antígenos heterólogos, em pacientes candidatos a transplante.

3.2 Objetivos Específicos

- Buscar o diagnóstico parasitológico de estrogiloidíase, utilizando as técnicas de sedimentação espontânea, de Rugai e cultura em placa de ágar, em amostras fecais de pacientes candidatos a transplante.
- Aplicar a reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando antígenos de larvas filarioide de *S. venezuelensis* para o diagnóstico imunológico da estrogiloidíase em pacientes candidatos a transplante.
- Aplicar a técnica imunoenzimática (ELISA) utilizando antígenos de larvas filarioide de *S. venezuelensis* para o diagnóstico imunológico da estrogiloidíase em pacientes candidatos a transplante.
- Aplicar a técnica de Western-Blotting (WB) utilizando antígenos de larvas filarioide de *S. venezuelensis* para o diagnóstico imunológico da estrogiloidíase em pacientes candidatos a transplante.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Aspectos históricos e taxonômicos

A primeira referência a *S. stercoralis* ocorreu em 1876, ocasião em que foi denominado *Anguillula stercoralis* por Bavay, ao analisar amostras de fezes diarreicas de soldados franceses em serviço no Vietnã (“diarreia da Conchinchina”) (Grove, 1996). Possuindo um ciclo evolutivo e morfologia complexa, o helminto recebeu diversas denominações até que, em 1902, Stiles e Hassal sugeriram a de *S. stercoralis*. No Brasil, o parasito foi identificado por Ribeiro da Luz em 1880 e referido por Moraes em 1948, como agente etiológico da estrongiloidíase. Essa helmintíase constitui um importante problema médico e social no Brasil pela sua possibilidade de evolução para formas graves (Paula; Costa-Cruz, 2011).

Após a análise do genoma mitocondrial de parasitos, puderam ser reconhecidas características filogenéticas que viabilizam estudos evolutivos. Com a reconstrução taxonômica, a espécie *S. stercoralis*, foi incluída no domínio Eukariota, reino Metazoa, filo Nematoda, classe Cromadorea, ordem Rhabditida, família Strongyloididae e gênero *Strongyloides* (NCBI, 2014).

Até hoje, 52 espécies foram descritas, sendo que somente duas são infectantes para humanos: *S. stercoralis*, com distribuição cosmopolita e *S. fuelleborni*, que parasita preferencialmente macacos, com a maioria dos casos de infecção humana sendo relatados em regiões da África central e Ásia (Grove, 1996).

4.2 Epidemiologia

A prevalência mundial da estrogiloidíase pode ser dividida em três categorias: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (> 5%) (Pires; Dreyer, 1993). As áreas hiperendêmicas estão situadas especialmente em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, na América Latina e África Subsaariana (Siddiqui; Berk, 2001). Há ainda, áreas endêmicas no sudeste dos Estados Unidos, Porto Rico e América Central. Nas áreas rurais do sudeste dos Estados Unidos, especialmente na região dos Apalaches, estudos apontam para uma prevalência entre 2,5% a 4% (Concha et al., 2005; Neumann et al., 2012).

Na América Latina e África a prevalência dessa helmintíase pode chegar a 50% (Genta; Lillibridge, 1989; Neumann et al., 2012). No Brasil, a estrogiloidíase é considerada uma doença negligenciada pelas autoridades de saúde pública, apesar do seu caráter endêmico e de, em algumas situações, resultar em formas graves (Paula; Costa-Cruz, 2011).

Segundo Paula e Costa-Cruz (2011), a média de ocorrência de *S. stercoralis* no Brasil entre 1990 a 2009 é de 5,5%, com a seguinte distribuição regional: norte 5,3%, nordeste 7,9%, centro-oeste 6,6%, sudoeste 3,9% e sul 4,0%. Diversos estudos apontam que a ocorrência de *S. stercoralis*, baseada em técnicas de diagnóstico parasitológico, variou de 0,3% a 13% em crianças (Castro et al., 2004; Monteiro et al., 2009; Silva et al., 2009), 2,0 a 6,0% em adultos (Macedo; Rey, 1996; Santos et al., 1998; Nunes et al., 2006; Machado et al., 2007; Machado et al., 2008a).

Diversos trabalhos envolvendo indivíduos imunocomprometidos vêm sendo realizados, estimando a ocorrência de *S. stercoralis* por técnicas parasitológicas (Paula; Costa-Cruz, 2011). Em etilistas variou de 2,7% a 33,3% (Oliveira et al., 2002; Zago-Gomes et al., 2002); 8,3% a 23% em indivíduos com neoplasias hematológicas (Graeff-Teixeira et al., 1997; Schaffel et al., 2001); 5,5% a 24,2% em infecção por HIV (Feitosa et al., 2001; Blatt; Cantos, 2003; Silva et al. 2005) e 2,5% a 30,1% em pacientes com AIDS (Dias et al., 1992; Costa-Cruz et al., 1996; Cimerman et al., 1999; Bachur et al., 2008). A ocorrência da estrongiloidíase em pacientes com HTLV-1 observada por Chieffi et al., (2000) foi de 12,1%, sendo que Mendonça et al., (2006) relataram a ocorrência de 3,8% em diabéticos. Um estudo realizado em quatro centros de transplantes em diferentes áreas geográficas do Brasil avaliou a frequência das infecções oportunistas endêmicas em pacientes transplantados de fígado e rim, sendo referida positividade de 2,4% para *S. stercoralis* (Batista et al., 2011).

4.3 Aspectos biológicos

S. stercoralis é um nematódeo que apresenta diversas formas evolutivas: ovo, fêmea partenogenética, larvas rabditoides, larvas filarioides, e macho e fêmea de vida livre (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

Os ovos têm formato elíptico, de parede fina e transparente, e são muito parecidos aos de ancilostomídeos. Medem em torno de 0,05 mm de comprimento

por 0,03 mm de largura em fêmeas partenogênicas, e 0,07 mm de comprimento e 0,04 mm de largura em fêmeas de vida livre (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

A fêmea partenogênica possui um corpo cilíndrico com aspecto filiforme longo, extremidade anterior arredondada e posterior afilada. Mede de 1,7 a 2,5 mm de comprimento por 0,03 a 0,04 mm de largura tendo revestimento formado por uma cutícula fina e transparente por toda a extensão do corpo. O aparelho digestivo é composto por boca trilabial, esôfago filariforme e longo, e intestino simples, terminando em ânus. O aparelho genital é constituído por vulva ventral, útero anfidelfo, ovários e ovidutos. É raramente encontrada em exames de fezes, ficando alojada na mucosa do intestino delgado, sobretudo no duodeno e porção inicial do jejuno (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

As larvas rabditoides recebem esse nome devido ao formato de seu esôfago em bulbo. Estas medem 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de largura. Apresentam cutícula fina e hialina, vestíbulo bucal curto e primórdio genital nítido, o que as diferencia das larvas rabditoides de ancilostomídeos nas quais o vestíbulo bucal é longo e há somente vestígios de primórdio genital. As larvas rabditoides (L1) sofrem ecdise, originando as larvas rabditoides (L2), e logo após larvas filarioides (L3) (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

As larvas filarioides são alongadas e finas, medindo 0,35 a 0,50mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de largura. Apresentam vestíbulo bucal curto e intestino terminado em ânus. A porção anterior é ligeiramente afilada e a porção posterior é finalizada em duas pontas (entalhada), o que as difere das larvas filarioides de ancilostomídeos nas quais a porção posterior é pontiaguda. Esta é a

forma infectante do parasito, que ao penetrar na pele do hospedeiro, dá início à infecção (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

O macho de vida livre possui aspecto fusiforme, com extremidade anterior arredondada. Mede 0,7 mm de comprimento por 0,04 mm de largura. O aparelho digestivo dispõe de boca trilabiada, esôfago tipo rabditoide, intestino terminando em cloaca. O aparelho genital contém testículos, vesícula seminal, canal deferente e canal ejaculador, que se abre na cloaca. Apresentam dois pequenos espículos que auxiliam na cópula (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

A fêmea de vida livre possui aspecto fusiforme com extremidade anterior arredondada e posterior afilada. Estima-se que possua de 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de largura. A cutícula é fina e transparente, com finas estriações. Apresenta aparelho digestivo simples com boca trilabiada, esôfago possui uma dilatação bulbar, o intestino simples e retilíneo, terminando em ânus. O aparelho genital é constituído por útero anfidelfo, ovários, ovidutos e a vulva com receptáculo seminal (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996).

4.4 Ciclo biológico

S. stercoralis tem a peculiaridade de realizar duplo ciclo evolutivo: o direto, partenogenético, e o indireto, sexuado ou de vida livre, ambos monoxênicos (Grove, 1996).

Após a eclosão dos ovos, as larvas rabditoides são eliminadas nas fezes e em condições adequadas de temperatura e umidade sofrem mudas originando as

larvas filarioides (ciclo direto). Podem, ainda, podem dar origem a machos e fêmeas de vida livre que, após a reprodução sexuada originam larvas rabditoides. Estas por sua vez sofrem mudas transformando-se em larvas filarioides (ciclo indireto). Após penetrarem pela pele ou mucosas de um hospedeiro suscetível, as larvas atingem os pulmões por via sanguínea, e são carregadas até a traqueia. São então deglutidas atingindo o tubo digestivo. No duodeno, após a maturação, as larvas transformam-se em fêmeas adultas, partenogenéticas, que se alojam na mucosa intestinal e liberam ovos embrionados. Esses eclodem dando origem as larvas rabditoides, que atingem a luz intestinal sendo eliminadas com as fezes (Grove, 1996; Costa-Cruz, 2005).

O ciclo biológico de *S. stercoralis* tem a particularidade de larvas rabditoides poderem sofrer mudas ainda na luz intestinal. As larvas filarioides assim originadas podem penetrar através da mucosa intestinal (autoinfecção interna) ou da pele da região perineal (autoinfecção externa). Esse processo faz com que a infecção tenha duração indefinida mesmo sem novas exposições a formas infectantes do parasito no ambiente (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis* (Adaptado de CDC, 2014. www.dpd.cdc.gov). (1) Larvas rabditoide eliminadas pelas fezes; (2) Desenvolvimento de adultos de vida livre; (3) Ovos são produzidos por fêmeas de vida livre; (4) Desenvolvimento de larva rabditoide a partir de ovos embrionados; (5) Transformação da larva rabditoide em filarioide; (6) Penetração da filarioide na pele; (7) Larva filarioide é carregada pelo sistema circulatório e pulmões, ocorre a migração da larva para a faringe, as larvas deglutidas chegam ao intestino transformando-as em fêmeas partenogênicas; (8) Fêmeas adultas no intestino; (9) Os ovos são depositados na luz intestinal e as larvas migram para luz intestinal.

4.5 Imunologia

Os helmintos são patógenos multicelulares e o sistema imune do hospedeiro humano desenvolveu um conjunto de mecanismos efetores especializados, centrados na resposta do tipo Th2, com o objetivo de controlar a infecção (Taylor et al., 2012).

Neste tipo de resposta, ocorre a produção das interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, resultando em resposta humoral mediada por IgE e resposta celular mediada por eosinófilos, mastócitos e neutrófilos, ao lado da ação das células caliciformes, produtoras de muco. Na resposta imune às helmintíases foram identificados como os principais componentes da regulação do sistema imune, além da resposta Th2, células T reguladoras, células B reguladoras e macrófagos (Taylor et al., 2012; Girgis et al., 2013) (Figura 2).

A resposta imune inata é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Estudos em camundongos indicam que durante a primeira infecção por *S. stercoralis*, os neutrófilos e eosinófilos são atraídos pelos componentes da membrana do parasito, combatendo a larva por intermédio de proteínas específicas (Bonne-Année et al., 2011; O'Connell et al., 2011).

Figura 2 - Dois cenários são considerados: no trato gastrointestinal, estão envolvidas imunidade inata e adaptativa. Os mecanismos efetores inatos incluem células globosas, as quais aumentam a produção de muco, alteram o tipo de muco e liberam a proteína efetora molécula- β resistina-símile (RELM- α); mastócitos e, alternativamente, macrófagos ativados, estimulados por citocinas da resposta Th2 e nuócitos (célula inata linfoide). Em diversos tecidos, larvas de helmintos que penetram pela pele podem ser interceptadas por eosinófilos dependentes de IL-5. Em órgãos internos, múltiplas populações de granulócitos e macrófagos são estimuladas por quimiocinas, citocinas e anticorpos para agredir o helminto via ação de mediadores pré-formados e metabólitos reativos (adaptado de Taylor et al., 2012).

Na infecção por *S. stercoralis*, dois mecanismos Th2 dependentes têm sido propostos para destruir as larvas filarioides: degranulação dos mastócitos e morte do parasito por ação direta de eosinófilos. Os mastócitos são ativados pela IL-4 e sua degranulação depende da presença de anticorpos IgE contra antígenos do parasito (Marcos et al., 2011).

Os helmintos não podem ser ingeridos por fagócitos em função do seu tamanho (Iriemenam et al., 2010). No entanto, a expulsão do parasito pode ser obtida pelo aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, ocasionado pela liberação de histamina após o contato com o antígeno (Marcos et al., 2011).

A capacidade do hospedeiro em expelir nematódeos intestinais está ligada à sua capacidade de induzir a resposta Th2 contra o parasito. Moléculas inflamatórias inespecíficas secretadas por macrófagos, TNF α e IL-1, contribuem para a proliferação de células caliciformes promovendo o aumento na secreção de muco, que reveste os parasitos, levando a sua expulsão (Maruyama et al., 2000). Se o parasito vence a primeira linha do epitélio, os *Toll-like Receptors* (TLRs) que fazem parte da resposta imune inata e adaptativa, reconhecem o mesmo via *Pathogen - Associated Molecular Patterns* (PAMPs), estimulando a produção de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias pelas células dendríticas e macrófagos (Negrão-Corrêa, 2001).

Os eosinófilos são componentes importantes no sistema imune, sobretudo no combate das infecções helmínticas. A IL-5 é uma citocina essencial para ativação, diferenciação e proliferação de eosinófilos (Iriemenam et al., 2010; Marcos et al., 2011). Na infecção por *S. stercoralis* a eosinofilia pode ser mais frequente se comparada a outras infecções parasitárias intestinais crônicas, pelo fato das fêmeas partenogenéticas estarem na submucosa do intestino e não na luz intestinal, fazendo com que a resposta inflamatória seja maior (Requena-Méndez et al., 2013). Essa resposta, ocasionada pela presença das fêmeas partenogenéticas e larvas na mucosa intestinal, é desencadeada por antígenos do

parasito que compõem imunocomplexos (Rodrigues et al., 2001; Machado et al., 2005). A presença de eosinofilia no sangue periférico é considerada um indicador para a necessidade da pesquisa de *estrongiloidíase* crônica, particularmente em indivíduos assintomáticos (Requena-Mendez et al., 2013).

A expansão e ativação de eosinófilos para destruir o parasito dependem da IL-5; quando a ação de IL-5 é suprimida, ocorre diminuição significativa da resposta Th2. Isto pode ser observado em pacientes com carcinomas metastáticos, síndrome nefrótica, glomerulonefrite crônica, subnutrição, etilismo crônico, diabetes mellitus, transplante renal, infecção por HIV e HTLV-1 (Costa-Cruz, 2005).

A maioria dos indivíduos com *estrongiloidíase* possuem anticorpos das classes IgG, IgA, IgM e IgE específicos, sendo o anticorpo IgG o mais frequentemente detectado, permanecendo por longo tempo mesmo após a cura da infecção (Liu; Weller, 1993; Concha et al., 2005; Marcos et al., 2011).

Nas infecções crônicas, a resposta imune humoral tem um papel importante. A IgA está relacionada com a eliminação das larvas, a IgE regula a autoinfecção e a IgG4 pode bloquear as respostas mediadas por IgE (Marcos et al., 2011). Sabe-se que as imunoglobulinas séricas IgG2 e IgG4 específicas são mais elevadas em pacientes imunocompetentes do que imunocomprometidos. Em pacientes imunocompetentes com *estrongiloidíase* os níveis de IgE são elevados indicando proteção. No entanto, na doença disseminada e nos casos de imunossupressão, os níveis de IgE total e específica podem estar dentro da normalidade, indicando um mau prognóstico (Costa-Cruz, 2005; Marcos et al., 2011).

4.6 Aspectos clínicos

Na maioria das vezes, a *estrongiloidíase* é assintomática ou oligoassintomática. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, naqueles que fazem uso de corticoesteroides, ou portadores de alterações anatômicas ou funcionais no tubo digestivo, pode assumir extrema gravidade levando a um quadro de hiperinfecção e/ou doença disseminada. Nestes indivíduos o processo de autoinfecção pode ser acelerado resultando em cargas parasitárias muito elevadas (hiperinfecção) (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996; Concha et al., 2005; Leyva et al., 2011).

Sabe-se que os corticosteroides exercem um efeito estimulatório direto sobre as larvas, acelerando as mudas e favorecendo a auto-infecção (Grove, 1996; Hernandez - Chavarría, 2000). Acredita-se que os corticoesteroides e alguns dos seus metabólitos atuem como mensageiros bioquímicos semelhantes aos produzidos pela fêmea parasita estimulando a postura dos ovos, a muda de larvas rabditoides em filarioides, aumentando a parasitemia e o risco de desenvolver a hiperinfecção e/ou a *estrongiloidíase* disseminada (Del Cárpio et al, 1995; Keiser; Nutman, 2004; De Bona; Basso, 2008).

Na forma disseminada da doença as larvas completam o ciclo, mas além do intestino e pulmões, são encontradas em sítios não usuais, como estômago, esôfago, linfonodos mesentéricos, pele, vesícula biliar, fígado, diafragma, pâncreas, coração, musculatura esquelética, ovários, rins, encéfalo e espaços meníngeos (Gryschek; Siciliano, 2005).

A patologia e a sintomatologia da estrogiloidíase não estão somente associadas à carga parasitária, mas também à função imunológica. Na forma aguda da infecção, podem ocorrer algumas manifestações clínicas decorrentes da penetração larvária, como lesões papulares pruriginosas e urticária inespecífica no local da invasão. Com a passagem das larvas pelos pulmões, algumas manifestações como tosse seca e dispneia podem ser observadas, decorrentes da pneumonite eosinofílica (síndrome de Loeffler). Manifestações gastrointestinais incluindo dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos podem ocorrer de forma intermitente (Liu; Weller, 1993; Grove, 1996; Fardet et al., 2007; Luna et al., 2007).

Na forma crônica da infecção os pacientes podem permanecer parasitados por longos períodos de tempo. A carga parasitária mantém-se em níveis baixos, podendo ocorrer manifestações como dor abdominal, principalmente epigástrica, náuseas, vômitos e diarreia (Gryschek; Siciliano, 2005).

4.7 Diagnóstico

Nas formas crônicas da estrogiloidíase, o indivíduo pode apresentar eosinofilia no sangue periférico que, em geral, é discreta ou moderada. Já em indivíduos hiperinfectados, geralmente não há eosinofilia, provavelmente em decorrência da imunossupressão (Gryschek; Siciliano, 2005).

4.7.1 Parasitológico

O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase é realizado através do encontro de larvas, principalmente nas fezes. Os métodos parasitológicos têm baixa sensibilidade, uma vez que a liberação de larvas nas fezes é pequena e irregular na maioria dos casos (Uparanukraw et al., 1999; Costa-Cruz et al., 2003). Dentre as técnicas parasitológicas indicadas para a pesquisa de larvas estão as de Baermann-Moraes e de Rugai, baseadas no hidro e termotropismo larvário. Porém, são necessárias pelo menos sete amostras de fezes colhidas em dias alternados para aumentar a sensibilidade para 100% (Uparanukraw et al., 1999; Hirata et al., 2007).

A cultura em placa de ágar (Koga et al., 1990), apresenta maior sensibilidade dentre os métodos parasitológicos, mas exige um tempo de 48 a 72 horas, maior do que em outras técnicas parasitológicas como Rugai e sedimentação espontânea, para obtenção dos resultados (Kobayashi et al., 1995, 1996; Hirata et al., 2007; Paula et al., 2013).

As técnicas de enriquecimento como as de cultura em papel-filtro em tubo de ensaio e cultura de larvas em carvão também apresentam maior sensibilidade, quando comparadas com as técnicas de termohidrotropismo, pois possibilitam a muda larvária e com isso, a melhor visualização e identificação das formas evolutivas, mesmo que presentes em pequenas quantidades no material fecal (Liu; Weller, 1993; De Carli, 2007).

4.7.2 Sorológico

Os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade nos casos de formas assintomáticas e no esclarecimento do diagnóstico clínico, no monitoramento de pacientes submetidos a tratamento anti-helmíntico e em inquéritos epidemiológicos (Costa-Cruz et al., 1997; Machado et al., 2001, 2003; Silva et al., 2003). Em geral, os testes sorológicos são de fácil execução e a obtenção de amostras de sangue é mais simples que a obtenção de amostras de fezes para o diagnóstico parasitológico (Van Doorn et al., 2007).

As técnicas sorológicas possuem algumas limitações, tais como a obtenção de quantidades de antígeno de *S. stercoralis* suficientes para o fracionamento e análise, e o fenômeno de “reação cruzada”, principalmente com outros nematódeos, dada a grande complexidade antigênica que esse helminto possui (Conway et al., 1994; Costa-Cruz et al., 2003; Rodrigues et al., 2007).

Pesquisas apontam a utilização de antígenos heterólogos, provenientes de espécies de roedores, *S. ratti* e *S. venezuelensis*, pois são de fácil obtenção, constituem uma fonte segura de antígenos e não representam risco para seus manipuladores, além de, principalmente, apresentarem uma alta correlação de resultados com *S. stercoralis*. Segundo Costa-Cruz et al., (1997), as sensibilidades dos antígenos de *S. stercoralis* e *S. ratti* foram de 94,4% e 92,5%, respectivamente, enquanto que as especificidades foram de 94,2% e 97,1% no teste de imunofluorescência indireta (Rossi et al., 1993; Costa-Cruz et al., 1997; Machado et al., 2001).

A RIFI utiliza diferentes preparações antigênicas tais como suspensão ou corte de larvas para detecção de diferentes classes de imunoglobulinas (Costa-cruz et al., 1997; Machado et al., 2001). Alguns trabalhos apontam que a sensibilidade da RIFI varia de 87 a 99%, enquanto que a especificidade é de 71 a 97% (Costa-Cruz et al., 1997; Koosha et al., 2004; Boscolo et al., 2007).

A sensibilidade do teste ELISA é elevada, variando de 84 a 100%, utilizando antígenos homólogos (Rossi et al., 1993; Ravi et al., 2002; Koosha et al., 2004; Krolewiecki et al., 2010) e heterólogos (Machado et al., 2003; Silva et al., 2003; Machado et al., 2008a; Gonçalves et al., 2012). Já a especificidade do teste varia entre 92 a 100%, utilizando antígenos homólogos (Ravi et al., 2002; Krolewiecki et al., 2010; Inês et al., 2013) e heterólogos (Machado et al., 2003; Machado et al., 2008a; Gonçalves et al., 2012).

A identificação e caracterização de antígenos de *S. stercoralis* são extremamente importantes para o desenvolvimento de testes imunológicos. A técnica de WB tem sido aplicada no imunodiagnóstico da estrogiloidíase, com alta especificidade e sensibilidade no reconhecimento de frações proteicas específicas por anticorpos presentes no soro de pacientes com estrogiloidíase (Conway et al., 1994; Silva et al., 2003). Segundo Uparanukraw et al., (1999), as frações proteicas reconhecidas pelos anticorpos possuem massas moleculares de 28, 31, 41 e 205 kDa. Diversos autores, realizando experimentos semelhantes, obtiveram uma variação nas massas moleculares das proteínas reconhecidas por anticorpos de pacientes com estrogiloidíase (Sato et al., 1990; Conway et al., 1993; Conway et al., 1994; Atkins et al., 1999, Silva et al., 2003).

Os testes sorológicos possuem a desvantagem da não distinção entre infecções recente e pregressa, mas têm sido úteis na avaliação da eficácia do tratamento. Gonzaga et al., (2011), mencionaram a utilização do teste de avididade de anticorpos IgG para diferenciação entre infecções recentes e pregressas por *S. stercoralis*. Estudos realizados por Lindo et al., (1996), revelaram que existe um pequeno, mas consistente declínio na resposta de IgG a *S. stercoralis* após tratamento de sucesso e que os indivíduos permanecem soropositivos por um período longo de tempo, pelo menos 18 meses em alguns casos.

4.7.3 Métodos moleculares

Técnicas moleculares vêm sendo obtidas para melhorar o diagnóstico da estrogiloidíase (Verweij et al., 2009; Kramme et al., 2010; Repetto et al., 2013), porém ainda não aplicáveis na rotina laboratorial.

A detecção de DNA do parasito em amostras fecais através da amplificação por reação de cadeia em polimerase em tempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos para porções do DNA ribossomal, mostrou-se um método diagnóstico sensível e específico para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*. Paula et al., (2013), demonstraram maior sensibilidade da reação de PCR em relação aos métodos parasitológicos para a detecção da infecção. Por outro lado, Sitta et al., (2014), evidenciaram que a PCR convencional pode ser utilizada em conjunto com os métodos parasitológicos para inquéritos epidemiológicos da estrogiloidíase.

4.8 A estrogiloidíase e transplantes de órgãos

As doenças infecciosas constituem risco considerável para os pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos e, dentre essas, as causadas por patógenos endêmicos merecem especial atenção (Batista et al., 2011). Essas infecções podem resultar de uma infecção adquirida através do órgão transplantado, após o transplante ou pela reativação de infecção latente (Kotton; Lattes, 2009).

A frequência de infecções parasitárias em pacientes transplantados é pouco conhecida, sendo estimada em 5% dos pacientes transplantados. Esse percentual certamente é subestimado, devido à pouca suspeita clínica e à ocorrência de casos que não são relatados na literatura especializada (Barsoum, 2004).

A preocupação com associação de transplantes e estrogiloidíase tem sido mencionada em países desenvolvidos, principalmente pelo fato de que muitos receptores e doadores de órgãos serem provenientes da América Latina, onde a endemicidade da infecção por *S. stercoralis* é importante (Marcos et al., 2011).

Casos de hiperinfecção por *S. stercoralis* têm sido observados após transplantes de órgãos sólidos, sobretudo após transplante renal (Devault et al., 1990; Palau; Pankey, 1997; Said et al., 2007; Valar et al., 2007). Alguns casos também foram descritos após transplante de fígado (Vilela et al., 2009) e de coração (Schaeffer et al., 2004; Masry; O'Donnell, 2005). Também foram relatados casos de estrogiloidíase disseminada após transplantes de medula óssea (Orlent et al., 2003; Barsoum, 2004; Dulley et al., 2009).

No Brasil, um estudo retrospectivo (2001 a 2006) utilizando 1.754 prontuários médicos, em quatro centros de transplante hepático e renal, foram encontrados 21 casos de enteroparasitoses associadas a diarreia, sendo que 2,4% (2 casos) foram positivos para *S. stercoralis* (Batista et al., 2011).

No início do processo de hiperinfecção em transplantados de órgãos sólidos podem ser observados alguns sintomas gastrointestinais, como pirexia, dor gastrointestinal e diarreia com sangue. A migração larvária acentuada pode ser manifestada por pneumonite com infiltrados bilaterais. Pode haver eosinofilia, embora esse achado não seja observado em pacientes sob corticoterapia. A maioria dos casos de estrongiloidíase ocorre nos primeiros seis meses após o transplante (Franco-Paredes et al., 2010; Coster, 2013).

Embora a maioria dos casos seja resultado de uma infecção latente no receptor, existem alguns relatos de casos de estrongiloidíase nos quais a infecção parasitária foi veiculada pelo órgão transplantado (Hoy et al., 1981; Ben-Youssef et al., 2005; Patel et al., 2008). Segundo Wirk e Wingard, (2009), dentre a população de pós-transplantados, os pacientes que receberam transplante de medula tiveram maior risco de hiperinfecção fatal por *S. stercoralis*. Em recente estudo de soroepidemiologia para *S. stercoralis* em pacientes latino americanos candidatos a transplantes, foi encontrada uma positividade de 6% (Fitzpatrick et al., 2010).

Dessa forma, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado com anti-helmínticos podem reduzir a morbidade e mortalidade da estrongiloidíase (Issa et al., 2011). Assim, a viabilização de um teste específico e sensível para aplicação

em doadores e receptores de órgãos procedentes de regiões endêmicas, pode evitar infecções graves por *S. stercoralis* (CDC, 2014).

5 MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

5.1.1 Experimentação animal

Os projetos experimentais de pesquisa cumprem as Leis (6.638/79 e 9605/98), o Decreto 24.645/34, os princípios éticos na Experimentação Animal (COBEA), os Princípios para Pesquisa envolvendo animais e outras instruções que regulamentam pesquisas com animais. Os trabalhos foram iniciados após aprovação do projeto de pesquisa número CEP-IMT 002/10, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP), São Paulo, Brasil.

5.1.2 Pesquisa com seres humanos

De acordo com as normas que regem as pesquisas que envolvam seres humanos, foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I). O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, posteriormente, ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado com o número 0123/10 (Apêndice II).

5.2 População de estudo

5.2.1 Pacientes para validação dos testes

A validação das técnicas sorológicas ELISA e WB utilizadas neste estudo foi objeto de estudo anterior realizado em nosso laboratório (LIM-06 “Imunopatologia da esquistossomose e outras parasitoses”, do Hospital das Clínicas da FMUSP) (Corral, 2014). Noventa e duas amostras de sangue e de fezes de pacientes ambulatoriais, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), de ambos os sexos, com idade entre 10 e 60 anos, foram divididas em três grupos baseando-se nos resultados de exames parasitológicos de fezes, conforme especificado adiante:

i-) *Grupo positivo*: 20 pacientes com diagnóstico parasitológico positivo para *S. stercoralis*;

ii-) *Grupo negativo*: 40 pacientes com diagnóstico parasitológico negativo;

iii-) *Grupo com outras parasitoses*: 32 pacientes com diagnóstico parasitológico para outras parasitoses intestinais monoinfectados (ancilostomídeos (n=4); *Ascaris lumbricoides* (n=2); *Blastocystis* spp (n=3); *Enterobius vermicularis* (n=1); *Endolimax nana* (n=3); *Giardia intestinalis* (n=3); *Hymenolepis nana* (n=1); *Schistosoma mansoni* (n=9)) ou polinfectados (ancilostomídeos, *H. nana* (n=1); *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis* spp, *E. nana*, *G. intestinalis*, *Endolimax nana* (n=1); *A. lumbricoides*, *Blastocystis* spp (n=1); *Endolimax nana*, *S. mansoni*, *Blastocystis* spp (n=1); ancilostomídeos, *E. coli*, *Entamoeba dispar/histolytica* (n=1)).

Inicialmente, uma investigação parasitológica foi conduzida pela Seção de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por técnicas empregadas na rotina nas amostras de fezes dos pacientes. Posteriormente, caso o resultado do diagnóstico parasitológico do paciente fosse positivo, o paciente era convocado, sendo solicitada, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, uma amostra de sangue e uma de fezes, antes do tratamento. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por cinco minutos para a separação do soro que foi estocado a -20°C até o momento do uso. As amostras de fezes obtidas foram processadas pelos métodos parasitológicos, de sedimentação espontânea (Lutz, 1919), Rugai (1954) de cultura em placa de ágar (Koga et al., 1991), para a confirmação do diagnóstico parasitológico.

5.2.2 Pacientes candidatos a transplante

Para avaliar a aplicabilidade das técnicas sorológicas em comparação com os métodos parasitológicos tradicionais, foram utilizadas uma amostra de soro e uma de fezes frescas de 150 pacientes candidatos a transplante, a saber: 50 para transplante renal; 50 para transplante de fígado; 50 para transplante de medula óssea, atendidos nos ambulatórios dos respectivos Serviços de Transplante do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os termos de anuência para a realização do estudo, emitidos pelas respectivas chefias dos grupos de transplante estão apresentados nos apêndices III, IV e V. Os pacientes

foram orientados a manter a amostra de fezes recém colhida em temperatura ambiente até a entrega do material no laboratório. Foram pesquisados dados sociodemográficos e clínicos da população de candidatos a transplantes.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm por cinco minutos para separação do soro que foi estocado a -20°C até o momento do uso. As amostras de fezes obtidas foram processadas pelos métodos de sedimentação espontânea, de Rugai e de cultura em placa de ágar, para o diagnóstico parasitológico.

5.3 Métodos Parasitológicos

5.3.1 Sedimentação Espontânea (Lutz, 1919)

Cinco gramas de fezes frescas foram colocados em um copo descartável de 250 mL, e foram acrescentadas 50 a 60 mL com água corrente. Depois de misturadas, as fezes foram colocadas em um cálice de sedimentação e filtradas através de um filtro descartável. O cálice foi deixado em repouso por duas horas. Logo após, o sedimento foi colhido com auxílio de uma pipeta *Pasteur* e colocado em uma lâmina, corado com solução de Lugol e examinado no microscópio (Olympus Cx41, Shinjuku, Tóquio, Japão), nos aumentos de 100 e 400X (De Carli, 2007).

5.3.2 Técnica de Rugai (Rugai et al., 1954)

Em um recipiente contendo material fecal fresco, foi colocado uma gaze dobrada e um elástico prendendo-a na superfície do pote. Em um cálice de sedimentação foi colocada água corrente aquecida a 40°C a 45°C. O recipiente com fezes foi transferido para o interior do cálice de sedimentação, de modo que o líquido entrasse em contato com a gaze. Após 120 minutos, foi colhido o sedimento com uma pipeta *Pasteur*. O sedimento foi diluído, corado com Lugol e examinado ao microscópio (Olympus Cx41, Shinjuku, Tóquio, Japão) com aumento de 100 e 400X (De Carli, 2007).

5.3.3 Cultura em placa de ágar (Arakaki et al., 1990; Koga et al., 1991)

Foram semeadas aproximadamente dois gramas de fezes frescas em placa de ágar em uma superfície de aproximadamente um centímetro de diâmetro. As placas foram lacradas com parafilme e incubadas na temperatura de 28°C por dois dias. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com álcool etílico 70% e o lavado foi colhido e centrifugado a 3000 rpm durante três minutos. Em seguida, o sedimento foi corado com solução de Lugol e analisado no microscópio (Olympus Cx41, Shinjuku, Tóquio, Japão), nos aumentos de 100 e 400X (De Carli, 2007).

5.4 Preparação dos antígenos de *S. venezuelensis*

5.4.1 Obtenção das larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (1986). Esta linhagem é mantida em *Rattus norvegicus* “Wistar” (Rodentia, Muridae), infectados experimentalmente no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil e foi gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Marlene Tiduko Ueta. Atualmente o parasito é mantido experimentalmente pela infecção em ratos da espécie *R. norvegicus* pelo Laboratório de Investigação Médica “Imunopatologia da Esquistossomose e outras parasitoses”, do Hospital das Clínicas da FMUSP (LIM 06), localizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo.

O material fecal fresco obtido de roedores foi colocado em um recipiente de vidro com carvão animal (na proporção de uma parte de fezes para três partes de carvão) e misturado com auxílio de um palito de madeira, formando uma textura uniforme e úmida. O recipiente de vidro foi incubado em estufa a 25°C–28°C, por dois dias. Após este procedimento, as larvas L3 foram recuperadas pela técnica de Rugai et al., (1954) (De Carli, 2007).

5.4.2 Extrato alcalino

O antígeno foi obtido de acordo com Machado et al., (2003), com algumas modificações. Aproximadamente 100mg (420.000) de larvas filarioides foram

ressuspensas em solução alcalina 0,15M NaOH (1,0mL) acrescida de inibidores de protease (50 μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A suspensão de larvas foi homogeneizada por sonicação (cinco ciclos de 20 pulsos), mantida em agitação a 4°C por uma hora. Posteriormente foi centrifugada a 12.400g por 30 minutos a 4°C, para a obtenção da fração antigênica. Após a do extrato antigênico, uma alíquota foi destinada para dosagem proteica pelo método de Lowry et al., (1951), obtendo-se 7,2 mg/mL.

5.4.3 Extrato salino

A técnica para obtenção do extrato salino em PBS foi adaptada de Gonzaga et al., (2011). Aproximadamente 100 mg (420.000) de larvas filarioides foram ressuspensos em tampão de homogeneização (PBS, Tampão salino fosfato 0,01M pH 7,2) suplementado com coquetel de inibidores de protease (50 μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O extrato salino foi obtido por sonicação e centrifugação a 12.400g durante 30 minutos a 4°C. Após a obtenção do extrato antigênico, uma alíquota foi destinada para dosagem proteica pelo método de Lowry et al., 1951, obtendo-se 1,3 mg/mL.

5.4.4 Cortes de larvas de *S. venezuelensis*

Para a realização dos cortes, foram utilizadas larvas filarioides de *S. venezuelensis*, que inicialmente foram lavadas por três vezes em Tampão Fosfato

Salino (PBS), e em seguida embebidas em “*Tissue Tek*” (Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA) para o emblocamento e congelamento em nitrogênio líquido. Após emblocadas, foram cortadas em crio-micrótomo (Microm HM-550-E, Walldorf, Germany) em cortes de 4 μ m. As lâminas foram congeladas e mantidas em -20°C até o momento do uso.

5.5. Testes Sorológicos

5.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Inicialmente foi realizada uma adaptação utilizando soros dos pacientes (grupos *i*, *ii* e *iii*) para validação dos testes diluídos a 1:20 e 1:40 e conjugado diluído a 1:400, 1:500, 1:600 e 1:800. Além disso, uma solução de bloqueio (PBS 0,01M, pH 7,2 acrescido de 5% leite em pó) foi avaliada na diluição do soro e na diluição do conjugado em duas concentrações de azul de Evans (1% e 4%).

Após os testes iniciais, o seguinte protocolo foi seguido: antes da adição dos soros nas lâminas, foram colocados PBS acrescido de 5% leite em pó (PBS-M 0,01M, pH 7,2) sobre os cortes. Em seguida foram adicionados os soros padrões positivo e negativo, e os testes diluídos a 1:40 em tampão PBS-M 0,01M, pH 7,2. Após incubação por 30 minutos a 37°C e lavagem em PBS 0,01M, pH 7,2, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) na diluição de 1:500 em PBS acrescido de 4% de azul de Evans. Após 30 minutos a 37°C, foram realizadas três lavagens de cinco minutos em PBS. Depois de secas em temperatura ambiente as lâminas foram montadas

com lâminulas e glicerina pH 9,5. Por fim, foi realizada a leitura em microscópio de imunofluorescência (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Königsallee, Göttingen, Germany), nos aumentos de 200 e 400X. Foram considerados positivos os soros que reagiram na diluição 1/40.

5.5.2 Teste Imunoenzimático (ELISA)

Inicialmente foi realizada uma avaliação do teste ELISA utilizando os extratos salino e alcalino solúveis como antígeno, os soros dos pacientes (grupos *i*, *ii* e *iii*) para validação dos testes na diluição de 1:100 e 1:200, e o conjugado na diluição de 1:30000 e 1:60000 em Tampão Fosfato Salino com 0,05% de Tween 20, pH 7,2 (PBS-T) e Tampão Fosfato Salino com 0,05% de Tween 20, pH 7,2 e com leite desnatado em pó 3% (PBS-TM).

Após a realização dos testes, foi aplicado o seguinte protocolo: as placas de poliestireno foram sensibilizadas com 10µg de frações antigênicas dos extratos alcalino e salino em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 durante 18 horas a 4°C. Após três lavagens sucessivas de cinco minutos com 300 µL de PBS-T. Foram adicionados os soros padrões negativos e positivos, e testes diluído em PBS-TM com diluição 1:200. Cada amostra de soro foi colocada em duplicata na placa. Após 45 minutos a 37°C, nova lavagem com PBS-T. Em seguida, foi adicionado o conjugado (anti-IgG humano de cabra marcado com peroxidase – Sigma - Aldrich, St Louis, MO, USA) diluído 1:30000 em PBS-TM. Após 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas sendo então adicionado 50 µL de substrato de

H₂O₂, o-fenilenodiamino (OPD) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 4,9-5,2, na ausência da luz e temperatura ambiente por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 25µL em cada poço de ácido sulfúrico 2N. Os valores densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) a 492 nm.

A média de DO de cada duplicata forneceu resultados da reatividade dos soros. Cinco amostras de soro de indivíduos saudáveis sem qualquer evidência clínica e epidemiológica de *estrongiloidíase* foram utilizadas como controle negativo da reação. O *cut-off* foi calculado com a média acrescida de dois desvios padrões de soros padrões negativos (Bassi et al., 1991). A reatividade dos soros foi expressa em índice ELISA (IE), valores da DO dividido pelo *cut-off*. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise pela curva ROC, para avaliar a sensibilidade e especificidade e obtenção do *cut-off* da reação (Greinerj et al., 1995).

5.5.3 Western-Blotting (WB)

Para determinar o perfil de bandas proteicas foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Aproximadamente 20µg por cm de gel dos extratos antigênicos alcalino e salino de larvas filarioides foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes e não redutoras, segundo Laemmli, (1970).

O gel de poliacrilamida de 12% foi preparado em suporte vertical para mini-gel (SCIE-PLAS, LTD, Cambridge, EN). Os extratos foram ressuspensos em tampão (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS a 10%, glicerol 20%, DTT 0,1M, Azul de bromofenol 0,2%), aquecidas a 100°C em banho-maria por cinco minutos e em seguida aplicadas no gel. Após a adição do tampão de corrida Tris 0,3% e glicina 1,5% procedeu-se a eletroforese a 100 V e 40 mA por aproximadamente duas horas. Foi utilizado padrão de massa molecular (10 a 260 kDa - Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) para determinação das bandas proteicas relativas. O gel foi corado com *Coomassie blue* a 0,5% em ácido acético a 1%, e digitalizado para documentação.

Em seguida, foi realizada a transferência das bandas proteicas para as membranas de PVDF poro de 20 µm (Bio-Rad Laboratories Headquarter, Hercules, CA, USA) em sistema Mini Trans-blot. O sistema de eletrotransferência foi realizado com a utilização de esponja, papéis filtro, gel, membrana, papéis filtro e esponja, formando um sanduíche, umedecidos em tampão de transferência (Tris 10 mM, Glicina 95 mM, etanol 20%, SDS 10%). A amperagem foi de 200 mA e a voltagem 50 V por aproximadamente duas horas. As membranas foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm e estocadas até o momento do uso.

Para determinar o perfil de bandas proteicas reconhecidas pelos soros positivos de *S. stercoralis* foi realizado o WB. Para estabelecer a validação da reação de WB, foi realizada uma avaliação inicial com os extratos de larvas filarioides e soros de pacientes (grupos *i*, *ii* e *iii*) em diferentes diluições 1:100 e 1:1000 e o anticorpo secundário anti-IgG humano fração Fc conjugado à

peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), diluído 1:500, 1:1000 e 1:2000 em tampão Tris-HCl Leite 5% (TM).

Após a validação inicial da reação, o seguinte protocolo foi aplicado: as membranas cortadas foram colocadas em canaletas, o anticorpo primário foi diluído a 1:100 em tampão de diluição do anticorpo (TM - Tris-HCl 1M pH 7,5 5%, NaCl 5M 2% acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó) por um período de aproximadamente 18 horas a 4°C, após bloqueio em tampão Tris-HCl 1M pH 7,5 acrescidos de 3% de Tween 20 e 3% de Leite por 1h a 4°C. O anticorpo secundário (anti-IgG humana fração Fc conjugado com peroxidase - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído 1:1000 no tampão de diluição do anticorpo por 1h30. A revelação foi realizada com 1 mL em cada canaleta DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na ausência de luz. As massas moleculares expostas foram comparadas ao padrão de massas molecular utilizado para análise.

5.6 Análise Estatística

A análise dos antígenos nos diferentes grupos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis utilizando comparações não paramétricas de Dumm (Neter et al., 1996; Kirkwood; Sterne, 2006).

A determinação dos valores de corte para cada antígeno foi elaborada a partir da análise da curva *receiver operating characteristic* (ROC) e medidas de diagnóstico, $p < 0,05$ (Programa STATA 11.0) (Greinerj et al., 1995).

Os resultados da reatividade dos soros estão expressos em índice ELISA (IE) – valores de absorbância dividido pelo *cut-off* (média acrescida de dois desvios padrões de soros padrões negativos), sendo consideradas positivas as amostras com $IE > 1,0$.

Foram considerados indivíduos positivos pela técnica de WB aqueles que apresentaram no mínimo duas bandas, dentre as frequentes em mais de 50% dos indivíduos do grupo I.

Para mensurar a eficiência, a concordância das técnicas diagnósticas e a razão de probabilidade foram calculados, respectivamente, a acurácia diagnóstica (AC), soma dos pacientes verdadeiros positivos com os verdadeiros negativos divididos pelo número total de pacientes; o índice Kappa (K) correlacionando a acurácia encontrada com a esperada; e o *Likelihood ratio* (LR), que relaciona a sensibilidade com a probabilidade de indivíduos sem a doença serem positivos laboratorialmente (Mineo et al., 2005).

5.7 Normas de Biossegurança

Os procedimento de coleta, manipulação de materiais biológicos e reagentes, além da utilização de equipamentos, estão em conformidade com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al., (2005).

6 RESULTADOS

6.1 Dados sociodemográficos e clínicos

Os dados sociodemográficos estão apresentados na Tabela 1. Nos pacientes candidatos a transplante a idade variou de 21 a 74 anos, sendo 60 (40%) do sexo feminino e 90 (60%) do sexo masculino.

Tabela 1 – Sexo e idade dos pacientes ambulatoriais candidatos a transplantes, HCFMUSP, 2012.

	TR n = 50	TH n = 50	TMO n = 50
Feminino, n (%)	19 (38)	19 (38)	22 (44)
Idade**	53,4 ($\pm 14,9$) - 61	59 ($\pm 13,2$) - 62	50,5 ($\pm 14,9$) - 54,5
Masculino, n (%)	31 (62)	31 (62)	28 (56)
Idade**	54,2 (± 11) - 57	56 ($\pm 11,2$) - 57	45,3 ($\pm 15,8$) - 48,5

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula-óssea;

** Média (desvio padrão) e mediana em anos.

Com relação às doenças que levaram à indicação de transplante observou-se o seguinte:

Dentre os pacientes candidatos a transplante renal, 23 indivíduos apresentavam nefropatia hipertensiva, cinco apresentavam nefropatia diabética, sete apresentavam nefropatia hipertensiva e diabética, seis apresentavam insuficiência renal crônica sem causa definida; outros casos foram encontrados como nefrite lúpica, litíase renal e nefropatia pós sepse;

Nos pacientes candidatos a transplante hepático, 22 indivíduos apresentavam cirrose por vírus C e/ou B, nove apresentavam cirrose alcoólica, seis

apresentaram hepatite autoimune, cinco apresentavam esteatose hepática não alcoólica e três apresentavam cirrose hepática criptogênica; em dois outros casos cirrose biliar primária e esquistossomose foram as causas de indicação do transplante.

Dentre os pacientes candidatos a transplante de medula óssea, 14 indivíduos apresentavam mieloma múltiplo, seis apresentavam leucemia mielóide aguda, seis apresentavam linfoma não Hodgkin, cinco apresentavam doença de Hodgkin; houve também um caso de anemia aplásica grave e um caso de mielofibrose. Em 17 pacientes desse grupo, não foi possível obter essa informação.

6.2 Teste diagnóstico não específico

A distribuição dos pacientes dos três grupos com relação ao número de eosinófilos no sangue periférico é apresentada na Tabela 2. Dos 150 pacientes candidatos a transplante, apenas 13 (8,6%) apresentavam eosinofilia.

Tabela 2 – Contagem de eosinófilos no sangue periférico nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.

Valores de Referência	TR n (%)	TH n (%)	TMO n (%)	Total
50 a 500 /mm ³	48 (32)	43 (28,6)	46 (30,6)	137 (91,3)
Eosinófilos				
> 500 /mm ³	2 (1,3)	7 (4,6)	4 (2,6)	13 (8,6)

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante medula óssea.

6.3 Diagnóstico parasitológico

Nos pacientes do *grupo i* (com exame parasitológico positivo para *S. stercoralis*), a positividade isolada de cada método foi de 40%, 55% e 95% utilizando a sedimentação espontânea, Rugai e cultura em placa de ágar, respectivamente.

Do total de 150 pacientes candidatos a transplante analisados, 9,3% (n=14) foram positivos para *S. stercoralis*, sendo que 4% (n=6) pela técnica de sedimentação espontânea, 3,3% (n=5) pela técnica de Rugai e 6,6% (n=10) pela cultura em placa de ágar (Tabela 4). Dos pacientes positivos pelos métodos parasitológicos, nove eram candidatos a transplante renal, três candidatos a transplante de fígado e dois a transplante de medula óssea. A idade e sexo dos 150 pacientes candidatos a transplante em relação à positividade dos métodos parasitológicos está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Sexo e idade em relação a positividade para *S. stercoralis*, utilizando os métodos parasitológicos dos pacientes ambulatoriais candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.

Sexo/ Idade	Todos os casos n = 150	Casos positivos* n = 14
Feminino , n (%)	60 (40)	3 (21,4)
Idade**	54,3 (14,4) – 61	63,6 (5,8) – 66
Masculino , n (%)	90 (60)	11 (78,6)
Idade**	51,8 (12,7) - 57	48,9 (11,6) - 52

*Casos positivos por *S. stercoralis* detectados pelos métodos parasitológicos;

**Média (desvio padrão) e mediana em anos.

Tabela 4 - Detecção de *S. stercoralis* utilizando os métodos parasitológicos isolados e combinados nas 150 amostras de fezes de pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.

Grupos	S	R	PA	S+R	S+PA	R+PA	S+R+PA	Total
Transplante Renal	0	2	5	0	1	1	0	9 (18%)
Transplante Hepático	2	0	0	0	0	0	1	3 (6%)
Transplante de Medula-Óssea	0	0	0	0	1	0	1	2 (4%)
Total	2	2	5	0	2	1	2	14

S – sedimentação espontânea; R – método de Rugai; PA – método de cultura em placa de ágar.

6.4 Caracterização dos antígenos

O perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes dos extratos alcalino e salino está demonstrado na Figura 4.

Figura 3 – SDS-PAGE 12% dos extratos antigênicos (alcalino, 2 e salino, 3), obtidos de larvas filarioides de *S. venezuelensis*. Padrão de massa molecular (1) de 150–15 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

6.5 Diagnóstico sorológico

6.5.1 Validação das técnicas sorológicas

6.5.1.1 RIFI

Após a validação da RIFI (Tabela 5) utilizando os soros dos indivíduos dos grupos *i*, *ii* e *iii*, pode-se observar uma distinção no padrão de fluorescência entre os soros positivos, negativos e com outras parasitoses (Figura 5). A RIFI demonstrou 95,0% de sensibilidade e 95,8% de especificidade. A reatividade cruzada na RIFI ocorreu com os soros dos pacientes do grupo *iii* com ancilostomídeos (2/7), *S. mansoni* (1/10) e *A. lumbricoides* (1/3).

Tabela 5 – Estimativa da acurácia diagnóstica da RIFI para o imunodiagnóstico da strongiloidíase humana.

Adaptações	Título	Grupos				Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	LR	ROC
		<i>i</i>		<i>ii e iii</i>					
		+	-	+	-				
Sem bloqueio + AE 1%	20	19	1	36	36	95% (75,1 – 99,8)	50% (37,8 – 62)	1,90	0,72
Sem bloqueio + AE 1%	40	19	1	26	46	95% (75,1 – 99,8)	65,2% (53,1 – 76,1)	2,74	0,80
Com bloqueio + AE 1%	40	19	1	14	58	95% (75,1 – 99,8)	80,5% (69,5 – 88,9)	4,89	0,88
Com bloqueio + AE 4%	40	19	1	3	69	95% (75,1 – 99,8)	95,8% (88,3 – 99,1)	22,80	0,95

Grupo *i* (n=20); Grupos *ii* e *iii* (n=72); AE - azul de “Evans”, sem bloqueio ou com bloqueio (PBS 0,01M, pH 7,2 com 5% de leite em pó); IC - intervalo de confiança; LR – likelihood ratio; AUC-ROC – área sob a curva.

Figura 4 - Cortes de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (4 μ), em aumento de 20X. (A) – Amostras de soro positivo (*grupo i*, A), soro negativo (*grupo ii*, B), soros positivos (*grupo iii*) para ancilostomídeo (C) e positivo para *S. mansoni* (D).

6.5.1.2 ELISA

Os dados foram analisados utilizando a curva ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), a área sob a curva (AUC) e o *likelihood ratio* (LR). De acordo com a análise da curva ROC, os resultados iniciais utilizando o extrato salino demonstraram sensibilidade de 76,5% a 93,3%, e especificidade de 40,7% a 88,9% (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros de diagnóstico na validação do teste ELISA em diferentes concentrações do soro dos indivíduos e do conjugado.

Soro	Conjugado	Tampão de Diluição	Cut-off	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	LR	ROC
80	30000	PBS-T	>2053	81,2 (48,2 - 97,7)	90 (68,3 - 98,8)	8,1	0,868
80	60000	PBS-T	>2159	72,7 (39 - 94)	95 (75,1 - 100)	14,5	0,877
100	30000	PBS-T	>1026	50 (23 - 77)	66,7 (46 - 83,5)	1,5	0,641
200	30000	PBS-T	>1387	66,7 (38,4 - 88,2)	80,8 (60,6 - 93,4)	3,4	0,748
100	60000	PBS-T	>601	85,7 (42,1 - 99,6)	46,7 (21,3 - 73,4)	1,6	0,790
200	60000	PBS-T*	>568	71,4 (29 - 96,3)	66,6 (38,3 - 88,1)	2,1	0,804
200	60000	PBS-TM**	>306	76,4 (50,1 - 93,2)	87,8 (73,8 - 95,9)	6,2	0,822
200	30000	PBS-TM	>276	90 (68,3 - 98,8)	88,9 (79,3 - 95,1)	8,1	0,940

*PBS-T – Tampão Fosfato Salino com 0,05% de Tween 20, pH 7,2; **PBS-TM - Tampão Fosfato Salino com 0,05% de Tween 20, pH 7,2, acrescido de leite desnatado em pó 3%.

A partir dessa avaliação inicial, os soros dos indivíduos dos grupos *i*, *ii* e *iii* foram diluídos em tampão PBS-TM 1:200 e o anticorpo secundário anti-IgG humano, foi diluído 1:30000 em PBS-TM. Para a avaliação dos dados gerados pela curva ROC, foi calculado a acurácia, definida como a soma dos pacientes

verdadeiros positivos com os verdadeiros negativos divididos pelo número total de pacientes.

Os soros dos indivíduos foram testados com os extratos alcalino e salino pelo teste ELISA, como demonstrado na Figura 6. A análise dos dados utilizando a curva ROC, demonstrou que os extratos antigênicos apresentaram sensibilidade de 90,0% e especificidade de 94,4% e 88,9% (Figura 7). A sensibilidade, a especificidade, a acurácia e o índice *Kappa* dos extratos estão apresentados na Tabela 7.

Figura 5 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro dos indivíduos com estrongiloidíase (*grupo i* (●)), negativos (*grupo ii* (▪)) e com outras parasitoses (*grupo iii* (▲)) por ELISA utilizando os extratos alcalino (A) e salino (B) de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo.

Figura 6 - Curva ROC, indicando o *cut-off*, a sensibilidade (SE), a especificidade (ES), área sob a curva (AUC) e o (LR) *likelihood ratio* segundo o programa Graph Pad Prism, versão 5.0 da técnica ELISA, utilizando os extratos alcalino (D) e salino (E) de *S. venezuelensis*. A curva ROC foi calculada a partir de amostras de soro de indivíduos positivos em relação aos indivíduos negativos e com outras parasitoses.

Tabela 7 - Parâmetros de diagnóstico dos extratos alcalino e salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* pelo teste ELISA.

Extratos Antigênicos	SE (%)	ES (%)	AC (%)	κ
Alcalino	90,0	94,4	93,5	0,815
Salino	90,0	88,9	89,2	0,712

SE – Sensibilidade; ES – Especificidade; AC – Acurácia; κ – índice *Kappa*

6.5.1.3 Western-Blotting

Para estabelecer as condições ideais de reação de WB, foi realizada a avaliação inicial, utilizando o extrato salino como antígeno, soros nas diluições 1:100 e 1:1000; e o anticorpo, diluído 1:500; 1:1000 e 1:2000 em tampão Tris-HCl Leite 5% (TM). Na Figura 8 está a avaliação inicial realizada com o soro e o anticorpo diluídos 1:1000 em tampão TM. Após essa avaliação estabeleceu-se que

os soros fossem diluídos 1:100 *overnight* e o anticorpo secundário 1:1000 em tampão TM. Nas Figuras 9 e 10 estão apresentados WB dos extratos alcalino e salino de *S. venezuelensis*.

Figura 7 – Avaliação inicial do WB frente ao extrato salino de *S.venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 e 2, *grupo i*), negativo (3, *grupo ii*); e com ancilostomídeo (4, *grupo iii*). Os soros e anticorpo secundário foram diluídos 1:1000. MM – Padrão de massa molecular de 220–12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Figura 8 – WB frente ao extrato alcalino de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 4, grupo *i*); negativos (5 a 8, grupo *ii*); e com outras parasitoses (11 a 15, grupo *iii*). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Figura 9 – WB frente ao extrato salino de *S. venezuelensis*, utilizando soros de indivíduos com estrongiloidíase (1 a 4, grupo *i*); negativos (5 a 8, grupo *ii*); e com outras parasitoses (11 a 15, grupo *iii*). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Foram consideradas componentes antigênicos imunodominantes aqueles com frequência maior ou igual a 50% nos pacientes no grupo *i* (Anexos I e II). Os soros foram considerados positivos quando apresentaram duas ou mais bandas imunodominantes.

Após análise chegou-se aos dados de sensibilidade e especificidade da técnica de WB. Os extratos alcalino e salino apresentaram sensibilidade de 100% e 90% e especificidade de 84,7% e 93,1%, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 – Parâmetros de diagnóstico dos extratos alcalino e salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* pelo teste WB.

Extratos	SE (%)	ES (%)	AC (%)	LR	K
Alcalino	100	84,7	88	6,6	0,707
Salino	90	93,1	92,4	13	0,788

SE – Sensibilidade; ES – Especificidade; AC – Acurácia Diagnóstica; LR – *Likelihood ratio*; κ – índice *Kappa*.

6.5.2 Aplicação das técnicas sorológicas nos pacientes candidatos a transplante

6.5.2.1 RIFI

Ao aplicar a técnica de RIFI nos pacientes candidatos a transplante, a positividade *S. stercoralis* foi de 16,6% (25/150) (Tabela 9). E a distribuição dos títulos de anticorpos anti-IgG *Strongyloides* detectado pela RIFI está apresentado na Tabela 10. O padrão de fluorescência entre os soros positivos e negativos dos pacientes candidatos a transplantes estão na Figura 11.

Tabela 9 - Positividade da RIFI para a detecção de *S. stercoralis* nos pacientes candidatos a transplante do HCFMUSP, 2012.

Pacientes	RIFI		Total
	+	-	
	n (%)	n (%)	
TR	11 (22)	39 (78)	50 (100)
TH	9 (18)	41 (82)	50 (100)
TMO	5 (10)	45 (40)	50 (100)
Total	25 (16,6)	125 (83,4)	150 (100)

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea.

Tabela 10 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti-IgG *Strongyloides* detectado pela RIFI utilizando como antígeno cortes de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, nos pacientes candidatos a transplantes do HCFMUSP, 2012.

Títulos	TR	TH	TMO	Total
	+	+	+	
>40	3	0	0	3
>80	2	3	1	6
>160	3	4	2	9
>320	0	2	2	4
>640	2	0	0	2
>1280	0	0	0	0
>2520	1	0	0	1
Total	11	9	5	25

*TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea.

Figura 10 - Cortes de larvas filarioides de *S. venezuelensis* (4 μ), em aumento de 20X. RIFI em pacientes candidatos a transplantes: soro renal positivo (A) e negativo (B), soro hepático positivo (C) e negativo (D), soro medula-óssea positivo (E) e negativo (F).

6.5.2.2 ELISA

Ao aplicar a técnica de ELISA nas amostras de soros de pacientes candidatos a transplante, a positividade no extrato alcalino e salino foi de 11,3% e 24,6%, respectivamente (Tabela 11). Nas Figura 12 e 13 está representado os soros reagentes e não reagentes para anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de pacientes candidatos, baseando-se no índice ELISA.

Tabela 11 - Positividade da técnica de ELISA utilizando extrato alcalino e salino de larvas de *S. venezuelensis* para a detecção de *S. stercoralis* nos pacientes candidatos a transplante do HCFMUSP, 2012.

Pacientes	ELISA*				Total
	Extrato Alcalino n (%)		Extrato Salino n (%)		
	+	-	+	-	
TR	7 (14)	43 (86)	9 (18)	41 (82)	50 (100)
TH	7 (14)	43 (86)	25 (50)	25 (50)	50 (100)
TMO	3 (6)	47 (94)	3 (6)	47 (94)	50 (100)
Total	17 (11,3)	133 (88,7)	37 (24,6)	113 (75,3)	150 (100)

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea.

Figura 11 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de pacientes candidatos a transplante renal (TR (●)), transplante hepático (TH (▪)) e transplante de medula óssea (TMO (▲)) por ELISA utilizando o extrato alcalino de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo.

Figura 12 – Detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de pacientes candidatos a transplante renal (TR (●)), transplante hepático (TH (▪)) e transplante de medula óssea (TMO (▲)) por ELISA utilizando o extrato salino de *S. venezuelensis*. Pacientes acima da linha no número 1 apresentam ELISA positivo.

6.5.2.3 WB

Ao aplicar a reação de WB nos pacientes candidatos a transplante, foram considerados positivos os soros que reconheceram duas ou mais bandas imunodominantes. Dos candidatos a transplantes, 31 (20,6%) e 28 (18,6%) foram positivos utilizando os extratos alcalino e salino, respectivamente (Tabela 12). A frequência de reatividade de bancas reconhecidas pelos soros de pacientes candidatos a transplante está apresentada na Tabela 13.

Tabela 12 – Positividade do WB, utilizando os extratos de *S. venezuelensis*, nos pacientes candidatos a transplante do HCFMUSP, 2012.

Grupos	WB				Total
	Extrato Alcalino n (%)		Extrato Salino n (%)		
	+	-	+	-	
TR	9 (18)	41 (82)	5 (10)	45 (90)	50 (100)
TH	16 (32)	34 (68)	7 (14)	43 (86)	50 (100)
TMO	6 (12)	44 (88)	16 (32)	34 (68)	50 (100)
Total	31 (20,6)	119 (79,3)	28 (18,6)	122 (81,4)	150 (100)

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea.

Tabela 13 – Frequência de reatividade de bandas reconhecidas pelos soros de pacientes candidatos a transplante, utilizando a técnica de WB com os extratos alcalino e salino de larvas filarioides de *S. venezuelensis*.

Bandas	Alcalino			Salino		
	Grupos n (%)			Grupos n (%)		
	TR	TH	TMO	TR	TH	TMO
260-210	1 (2)		4 (8)	2 (4)	1 (2)	
250-240				10 (20)		
200				1 (2)		
190			2 (4)	5 (10)	1 (2)	
175-160	6 (12)	27 (54)	9 (18)	4 (8)		
110-140	11 (22)	27 (54)	18 (36)	11 (22)	14 (28)	2 (4)
100-95	10 (20)	1 (2)	8 (16)		5 (10)	
75-70	3 (6)	5 (10)	2 (4)	3 (6)	1 (2)	1 (2)
66	2 (4)	3 (6)	5 (10)	1 (2)	1 (2)	
60-58	4 (8)	1 (2)	3 (6)	4 (8)	2 (4)	1 (2)
54-49	4 (8)	11 (22)	13 (26)	1 (2)	13 (26)	2 (4)
45	3 (6)			1 (2)	2 (4)	
37-40	4 (8)	2 (4)	3 (6)	5 (10)	12 (24)	4 (8)
39-36	14 (28)	15 (30)	10 (20)		4 (8)	
33-30	4 (8)	8 (16)	8 (16)		7 (14)	1 (2)
29-27	8 (16)	1 (2)	4 (8)		7 (14)	
22-20		2 (4)	4 (8)		1 (2)	
15	15 (30)	2 (4)	2 (4)	5 (10)	10 (20)	
10-12	3 (6)	6 (12)			2 (4)	

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea.

A frequência de bandas imunodominantes reconhecidas pelos soros dos pacientes estão representadas nas Figuras 14 e 15. Nas Figuras 16 e 17 estão apresentados WB dos extratos alcalino e salino de *S. venezuelensis*, nos pacientes candidatos a transplante.

Figura 13: Frequência de bandas imunodominantes reconhecidas pelos soros dos pacientes candidatos a transplante, utilizando o extrato alcalino de *S. venezuelensis*.

Figura 14: Frequência de bandas imunodominantes reconhecidas pelos soros dos pacientes candidatos a transplante, utilizando o extrato salino de *S. venezuelensis*.

Figura 15 - WB frente ao extrato alcalino de *S. venezuelensis*, utilizando soros dos pacientes candidatos a transplante: renal reagentes (1 e 2) e não reagente (3); hepático reagentes (4 e 5), e não reagente (6); e medula óssea reagentes (7 e 8) e não reagente (9). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Figura 16 - WB frente ao extrato salino de *S. venezuelensis*, utilizando soros dos pacientes candidatos a transplante: renal reagentes (1 e 2) e não reagente (3); hepático reagentes (4 e 5), e não reagente (6); e medula óssea (7 e 8) reagentes e não reagente (9). MM – Padrão de massa molecular de 260–10 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

6.5.3. Comparação de técnicas

A comparação de técnicas utilizadas para o diagnóstico de *S. stercoralis* em pacientes candidatos a transplante está demonstrada nas Tabelas 14 e 15. As técnicas sorológicas RIFI e ELISA, revelaram 30% de soros reagentes, enquanto os métodos parasitológicos obtiveram 9,3% de positividade para *S. stercoralis*. Cotejando as técnicas sorológicas com as parasitológicas, nota-se que em apenas quatro pacientes dentre os positivos pelas técnicas sorológicas, foram encontradas larvas nas fezes.

Tabela 14 - Comparação das técnicas sorológicas RIFI, ELISA e WB para detecção de *S. stercoralis* nos pacientes candidatos a transplante do HCFMUSP, 2012.

Métodos			Grupos			Total
RIFI	ELISA	WB	TR n (%)	TH n (%)	TMO n (%)	
+	+	+	3 (6)	5 (10)	0 (0)	8 (5,3)
+	+	-	0 (0)	1 (2)	1 (2)	2 (1,3)
+	-	+	1 (2)	1 (2)	3 (6)	5 (3,3)
-	+	+	0 (0)	8 (16)	6 (12)	14 (9,3)
+	-	-	3 (6)	3 (6)	1 (2)	7 (4,6)
-	+	-	4 (8)	12 (24)	2 (4)	18 (12)
-	-	+	7 (14)	5 (10)	12 (24)	24 (16)
-	-	-	32 (64)	15 (30)	25 (50)	72 (48)
Total			50 (100)	50 (100)	50 (100)	150 (100)

No teste ELISA e WB foram considerados os dois extratos antigênicos; (+) soros reagentes, (-) soros não reagentes, TR – transplante renal; TH – transplante hepático e TMO – transplante de medula óssea.

Tabela 15 - Comparação dos métodos parasitológicos e sorológicos (RIFI, ELISA e WB), para o diagnóstico de *S. stercoralis* nos pacientes candidatos a transplante do HCFMUSP, 2012.

Grupos	Métodos				Total
	P+S ⁺	P-S ⁺	P+S ⁻	P-S ⁻	
TR	4	14	5	27	50
TH	1	34	2	13	50
TMO	0	25	2	23	50
Total	5	73	9	63	150

TR – transplante renal; TH – transplante hepático; TMO – transplante de medula óssea; P - métodos parasitológicos (sedimentação espontânea, Rugai e cultura em placa de ágar), S- métodos sorológicos (RIFI; ELISA e WB considerando os extratos alcalino e salino).

Nas Tabelas 16, 17 e 18 estão apresentadas as correlações entre os resultados das técnicas parasitológicas e sorológicas, o índice Kappa e o valor preditivo positivo e negativo nos pacientes candidatos a transplantes.

Tabela 16 – Correlação entre as técnicas parasitológicas e sorológicas nos pacientes candidatos a transplante renal, HCFMUSP, 2012.

Técnica Sorológica	Parasitológico				Total		Kappa (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
	Negativo		Positivo						
	n	%	n	%	n	%			
WB Alcalino									
Negativo	35	70,0	6	12,0	41,0	82,0	0,187	33,3	85,4
Positivo	6	12,0	3	6,0	9,0	18,0	(-0,134; 0,508)	(7,5; 70,1)	(70,8; 94,4)
WB Salino									
Negativo	39	78,0	6	12,0	45	90,0	0,344	60,0	86,7
Positivo	2	4,0	3	6,0	5	10,0	(-0,003; 0,691)	(14,7; 94,7)	(73,2; 94,9)
ELISA Alcalino									
Negativo	37	74,0	6	12,0	43	86,0	0,258	42,9	86,0
Positivo	4	8,0	3	6,0	7	14,0	(-0,079; 0,595)	(9,9; 81,6)	(72,1; 94,7)
ELISA Salino									
Negativo	35	70,0	6	12,0	41	82,0	0,187	33,3	85,4
Positivo	6	12,0	3	6,0	9	18,0	(-0,134; 0,508)	(7,5; 70,1)	(70,8; 94,4)
RIFI									
Negativo	34	68,0	5	10,0	39	78,0	0,252	36,4	87,2
Positivo	7	14,0	4	8,0	11	22,0	(-0,064; 0,568)	(10,9; 69,2)	(72,6; 95,7)
Total	41	82,0	9	18,0	50	100			

Kappa – índice Kappa; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo.

Tabela 17 – Correlação entre as técnicas parasitológicas e sorológicas nos pacientes candidatos a transplante hepático, HCFMUSP, 2012.

Técnica Sorológica	Parasitológico				Total		Kappa (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
	Negativo		Positivo						
	n	%	n	%	n	%			
WB Alcalino									
Negativo	31	62,0	3	6,0	34	68,0	-0,112	0,0	91,2
Positivo	16	32,0	0	0,0	16	32,0	(-0,226; 0,002)	(0; 20,6)	(76,3; 98,1)
WB Salino									
Negativo	40	80,0	3	6,0	43	86,0	-0,092	0,0	93,0
Positivo	7	14,0	0	0,0	7	14,0	(-0,170; -0,014)	(0; 41)	(80,9; 98,5)
ELISA Alcalino									
Negativo	40	80,0	3	6,0	43	86,0	-0,092	0,0	93,0
Positivo	7	14,0	0	0,0	7	14,0	(-0,170; -0,014)	(0; 41)	(80,9; 98,5)
ELISA Salino									
Negativo	23	46,0	2	4,0	25	50,0	-0,040	4,0	92,0
Positivo	24	48,0	1	2,0	25	50,0	(-0,171; 0,091)	(0,1; 20,4)	(74; 99)
RIFI									
Negativo	38	76,0	3	6,0	41	82,0	-0,099	0,0	92,7
Positivo	9	18,0	0	0,0	9	18,0	(-0,187; -0,011)	(0; 33,6)	(80,1; 98,5)
Total	47	94,0	3	6,0	50	100			

Kappa – índice Kappa; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo.

Tabela 18 – Correlação entre as técnicas parasitológicas e sorológicas nos pacientes candidatos a transplante de medula-óssea, HCFMUSP, 2012.

Técnica Sorológica	Parasitológico				Total		Kappa (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
	Negativo		Positivo						
	n	%	n	%	n	%			
WB Alcalino									
Negativo	41	82,0	2	4,0	43	86,0	-0,066	0,0	95,3
Positivo	7	14,0	0	0,0	7	14,0	(-0,140; 0,008)	(0; 41)	(84,2; 99,4)
WB Salino									
Negativo	33	66,0	2	4,0	35	70,0	-0,076	0,0	94,3
Positivo	15	30,0	0	0,0	15	30,0	(-0,174; 0,022)	(0; 21,8)	(80,8; 99,3)
ELISA Alcalino									
Negativo	45	90,0	2	4,0	47	94,0	-0,050	0,0	95,7
Positivo	3	6,0	0	0,0	3	6,0	(-0,097; -0,003)	(0; 70,8)	(85,5; 99,5)
ELISA Salino									
Negativo	40	80,0	2	4,0	42	84,0	-0,068	0,0	95,2
Positivo	8	16,0	0	0,0	8	16,0	(-0,146; 0,010)	(0; 36,9)	(83,8; 99,4)
RIFI									
Negativo	42	84,0	2	4,0	44	88,0	-0,064	0,0	95,5
Positivo	6	12,0	0	0,0	6	12,0	(-0,133; 0,005)	(0; 45,9)	(84,5; 99,4)
Total	48	96,0	2	4,0	50	100			

Kappa – índice Kappa; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo.

7 DISCUSSÃO

Sabe-se que a *estrongiloidíase* é uma doença parasitária negligenciada, com prevalência em muitos países. A presença da infecção, ainda que subclínica, em pacientes imunodeprimidos ou que serão submetidos à imunossupressão, representa um problema relevante, sobretudo pela possibilidade de hiperinfecção ou doença disseminada (Marty, 2009; CDC, 2014; Levenhagen; Costa-Cruz, 2014). O risco dessas complicações em pacientes transplantados é alto, sobretudo se a detecção e tratamento da infecção por *S. stercoralis* não forem adequadamente realizados quando esses pacientes estiverem aguardando o transplante (Marty, 2009).

A eosinofilia no sangue periférico é um marcador comum em infecções helmínticas, podendo estar presente de forma intermitente em pacientes com infecção crônica por *S. stercoralis*. Já em pacientes com hiperinfecção ou doença disseminada, a contagem dos eosinófilos frequentemente não se altera, provavelmente em função de processo imunodepressor (Schaeffer et al., 2004; Roxby et al., 2009; Agrawal et al., 2009). Devido à intermitência desse achado hematológico, a ausência do mesmo não pode ser considerada fator de exclusão para *estrongiloidíase*, mas a sua presença deve indicar a busca insistente do diagnóstico dessa parasitose. Na presente casuística apenas 13 dentre os 150 pacientes candidatos a transplante apresentaram eosinofilia no sangue periférico, sendo que o diagnóstico de *estrongiloidíase* pelas técnicas parasitológicas foi obtido em apenas dois e a positividade, em pelo menos uma das técnicas sorológicas, foi observada em apenas oito deles.

O diagnóstico dessa helmintíase dá-se principalmente pela pesquisa de larvas nas fezes; no entanto, a sensibilidade dos métodos parasitológicos é baixa, especialmente nos casos crônicos onde a eliminação de larvas é pequena e intermitente, podendo resultar em resultados falso-negativos (Dreyer et al., 1996; Uparanukraw et al., 1999; Zaha et al., 2000). Ainda assim, os métodos parasitológicos ainda são considerados como padrão ouro no diagnóstico da estrogiloidíase.

Baseando-se nos resultados das técnicas parasitológicas obtidos nos pacientes do *grupo i*, pode-se observar maior sensibilidade da cultura em placa de ágar (95,0%) em relação aos outros métodos parasitológicos. Esses resultados melhores que os obtidos por Kobayashi et al., (1996), Uparanukraw et al., (1999) e similares aos apresentados por Inês et al., (2011).

Do mesmo modo, na detecção da infecção por *S. stercoralis* em pacientes candidatos a transplante, pode-se perceber que a cultura em placa de ágar, isoladamente ou em associação, obteve melhores resultados em relação às técnicas de Rugai e sedimentação espontânea. Esses resultados estão de acordo com Repetto et al., (2010), indicando a utilização da cultura em placa de ágar em associação com outros métodos parasitológicos para pesquisa de *S. stercoralis* em pacientes sob risco de infecção, sobretudo em áreas endêmicas. No entanto, Requena-Méndez et al., (2013), destacaram que a cultura em placa de ágar apresenta alto custo, consome tempo e apresenta sensibilidade insatisfatória nos casos crônicos, além da possibilidade de infecção para os manipuladores. Destarte

essa técnica não é executada pelos laboratórios de rotina em diagnóstico parasitológico.

Neste estudo, a positividade dos pacientes candidatos a transplantes para *S. stercoralis* considerando os métodos parasitológicos foi de 9,3%. Há poucos relatos na literatura sobre a ocorrência de *S. stercoralis* em pacientes candidatos a transplante. Em um trabalho de revisão de prontuários que incluiu 1754 pacientes candidatos a doadores ou receptores de transplantes de rim e fígado, em quatro regiões do Brasil, Batista et al., (2013), verificaram 2,4% de ocorrência de *S. stercoralis*. Esse estudo não tece nenhum comentário relativo às técnicas diagnósticas empregadas, bem como número de amostras examinadas. Por outro lado, diversos relatos sobre a ocorrência deste helminto em diferentes formas de imunossupressão têm sido encontrados na literatura. Analisando, doenças hematológicas, Graeff-Teixeira et al., (1997) e Schaffel et al., (2001), obtiveram 8,3% e 4% de positividade, utilizando os métodos parasitológicos de sedimentação espontânea e Baermann-Moraes. Machado et al., (2008b), em pacientes com neoplasia gastrointestinal encontraram uma positividade de 9,1% pelo método de sedimentação espontânea. Zago-Gomes et al., (2002), obtiveram uma frequência de 25,8% em pacientes etilistas utilizando também a técnica de sedimentação espontânea; além disso, destacaram a infecção por *Strongyloides* como sendo a maior encontrada na população estudada em relação às outras parasitoses. Em pacientes infectados com HTLV-1, Chieffi et al., (2000), encontraram uma frequência de 12,1% utilizando três métodos parasitológicos (sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e Harada-Mori).

Considerando as desvantagens dos métodos parasitológicos, como a dificuldade de obtenção de amostras de fezes, o tempo adquirido para realização e a intermitência da eliminação larvária, sobretudo em casos assintomáticos, o diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase pode ser insatisfatório. Assim, as técnicas imunológicas e moleculares vêm sendo desenvolvidas para o aprimoramento do diagnóstico dessa infecção (Grove, 1996; Olsen et al., 2009). Nesse contexto, as técnicas sorológicas, principalmente as imunoenzimáticas, têm representado uma boa alternativa (Rossi et al., 1993).

A dificuldade no desenvolvimento das técnicas sorológicas para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase está na obtenção de larvas de *S. stercoralis*, a qual tem sido superada pela possibilidade de utilização de larvas de outras espécies de *Strongyloides* (Grove; Blair, 1981; Costa-Cruz et al., 1997). A utilização dos antígenos heterólogos como os de *S. venezuelensis* ou de *S. ratti* vem sendo descrita por diversos autores como alternativa para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana, uma vez que resultam em valores de sensibilidade e especificidade comparáveis aos dos antígenos homólogos (Costa-Cruz et al., 2003; Rodrigues et al., 2007; Van Doorn et al., 2007; Gonçalves et al., 2012). No presente trabalho, larvas filarioides de *S. venezuelensis* foram utilizadas como fonte de antígenos, diante de sua disponibilidade e da ênfase dada atualmente na literatura com relação à sua utilidade (Machado et al., 2008a; Feliciano et al., 2010; Gonçalves et al., 2012).

A técnica de RIFI tem sido descrita como um método complementar para o diagnóstico da estrogiloidíase. Estudos indicam que a RIFI teve maior

sensibilidade do que os métodos parasitológicos, 98% e 81% respectivamente (Grove, Blair, 1981; Sato et al., 1991; Boscolo et al., 2007). Num estudo de Costa-Cruz et al., 1997, utilizando *S. ratti* como antígeno, a sensibilidade e a especificidade da RIFI foram de 92,5% e 97,1%, respectivamente. No presente trabalho a RIFI foi avaliada em pacientes dos *grupos i, ii e iii*, resultando em 95% de sensibilidade e 95,8% de especificidade. Machado et al., (2001) e (2008a), utilizando a RIFI com antígenos de *S. venezuelensis* para o diagnóstico imunológico da estrongiloidíase demonstraram 93,3-100% e 96,6-100%, sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Em relação aos pacientes candidatos a transplante, a positividade pela RIFI foi de 16,6%. Machado et al., (2008b), analisando amostras de pacientes com neoplasia gastrointestinal, demonstraram uma positividade de 21,2%.

As diretrizes atuais da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, da Sociedade Americana de Transplantes, do Centro de Controle e Prevenção de Doenças e da Sociedade Americana de Transplante de Medula Óssea, têm recomendado o teste ELISA para triagem de candidatos a transplante provenientes de áreas endêmicas e ou com sintomas gastrointestinais ou com eosinofilia presente antes do transplante de órgãos sólidos ou de células-tronco hematopoiéticas (Roxby et al., 2009; CDC, 2014).

Em relação ao antígeno utilizado nos testes imunoenzimáticos, o extrato salino tem sido relatado com muita frequência, talvez pelo fato do tampão fosfato ser muito utilizado em diferentes procedimentos (Conway et al., 1994; Siddiqui et al., 1997; Costa-Cruz et al., 2003; Van Doorn et al., 2007; Inês et al., 2013). Por

outro lado, o extrato alcalino também tem sido utilizado como antígeno para o imunodiagnóstico dessa helmintíase (Machado et al., 2003; Gonçalves et al., 2012). Neste estudo foram utilizados os tampões salino e alcalino para a obtenção dos extratos antigênicos.

O teste ELISA é considerado superior aos outros testes sorológicos, principalmente pela praticidade, segurança e disponibilidade de reagentes (Liu; Weller, 1993). A sensibilidade do teste pode variar de 85-97%, e a especificidade pode chegar a 100% (Rossi et al., 1993; Liu; Weller, 1993; Uparanukraw et al., 1999; Koosha et al., 2004; Machado et al., 2008a; Feliciano et al., 2010). Neste estudo, a sensibilidade obtida nos pacientes dos *grupos i, ii e iii* foi de 90,0%, com os dois extratos antigênicos. A especificidade foi de 94,4% e 88,9%, para os extratos alcalino e salino, respectivamente (Corral, 2014).

Ao aplicar o teste ELISA nas amostras dos pacientes candidatos a transplante, obtivemos 29,3% de positividade considerando os dois extratos. Valores inferiores de positividade utilizando o teste ELISA foram apresentados por Schaffel et al., (2001) (13%) e por Machado et al., (2008b) (12,1%).

A técnica de WB também tem sido utilizada no imunodiagnóstico da estrogiloidíase, apresentando altos valores de especificidade e sensibilidade, utilizando tanto *S. stercoralis* ou de espécies heterólogas como antígeno (Conway et al., 1994; Silva et al., 2003). Os valores de sensibilidade e de especificidade apresentados pelos pacientes dos grupos *i, ii e iii* foi de 90% e 88,9-94,4%, considerando os dois extratos antigênicos (Corral, 2014). Valores superiores de sensibilidade e especificidade foram apresentados por Machado et al., (2008b).

Considerando o extrato alcalino, resultados semelhantes foram demonstrados por Feliciano et al., (2010).

Quando da aplicação do WB nos pacientes candidatos a transplante, a positividade foi de 34%, considerando os dois antígenos. Como na literatura não tem sido mencionada a aplicação da técnica de WB em amostras de pacientes imunodeprimidos, o presente trabalho constitui, provavelmente, o primeiro relato da utilização desta técnica no imunodiagnóstico da *estrongiloidíase* nesse tipo de paciente.

A fração de 40-35 kDa foi a mais frequente. Resultados similares, demonstrando as bandas de 45 kDa e de 35-28 kDa foram relatados por autores que utilizaram antígeno heterólogo de *S. venezuelensis* (Machado et al., 2008a; Gonzaga et al., 2011). As mesmas frações também foram demonstradas por Silva et al., (2003) utilizando como fonte de antígeno *S. ratti*. Siddiqui et al., (1997), utilizando antígeno homólogo identificaram a fração de 41kDa como imunogênica.

Dentre as bandas imunodominantes reconhecidas pelo soro dos pacientes candidatos a transplante, podemos destacar a fração de 40-37 kDa e 39-36 kDa nos extratos alcalino e salino, respectivamente.

Considerando duas ou mais técnicas sorológicas para o imunodiagnóstico da *estrongiloidíase*, independente do antígeno, 19,3% dos pacientes candidatos a transplante foram positivos. Machado et al., (2008b), sugeriram a combinação de técnicas sorológicas para triagem de pacientes imunodeprimidos, com o quê demonstraram 24,2% de positividade utilizando ELISA e RIFI.

Neste estudo, verificou-se uma pequena concordância entre os resultados do diagnóstico parasitológico e sorológico nos três grupos de pacientes candidatos a transplante, algumas possibilidades podem justificar tais resultados.

Segundo Wirk e Wingard, (2009), as técnicas sorológicas podem resultar em falso-negativos em pacientes imunocomprometidos, com menor sensibilidade em pacientes com doença disseminada e/ou hiperinfecção (Buonfrate et al., 2013). Por outro lado, alguns medicamentos ou condições clínicas dos pacientes podem comprometer os resultados dos testes imunológicos. Pelo fato de termos utilizado apenas uma amostra de fezes para análise parasitológica, é possível que os indivíduos que apresentaram-se positivos em pelo menos uma técnica imunológica e negativos ao exame parasitológico devessem ser considerados para tratamento específico.

Em relação aos pacientes candidatos a transplante renal, foi observada maior concordância entre os resultados dos métodos parasitológicos e sorológicos para o diagnóstico da *estrongiloidíase*, porém ainda com baixos valores de índice Kappa.

Vale a pena ressaltar que o número de pacientes sob uso de imunossupressores no momento da coleta das amostras foi bastante reduzido nos três grupos. Por esta razão a influência dessas drogas nos resultados das técnicas sorológicas deve ter sido desprezível.

As limitações deste estudo tais como a análise de apenas uma amostra fecal, pode explicar o reduzido número de pacientes com diagnóstico parasitológico

de estrogiloidíase e ter influído nos baixos índices de concordância entre as técnicas sorológicas e parasitológicas. Ainda assim podemos dizer que o emprego de técnicas sorológicas, sobretudo em combinação, revelou um número apreciável de pacientes que deveriam ser alvo de tratamento específico ou, alternativamente, a uma investigação parasitológica com o exame de maior número de amostras. As características da casuística aqui estudada não permitiu identificar uma técnica de imunodiagnóstico que apresentasse desempenho indiscutivelmente superior às demais.

8 CONCLUSÕES

- A cultura em placa de ágar deve fazer parte do painel de técnicas parasitológicas para diagnóstico de estrogiloidíase em pacientes candidatos a transplante.
- A utilização de técnicas imunodiagnósticas, principalmente em combinação, pode ser empregada como método de triagem de pacientes em fila de transplante.

9 ANEXOS

Anexo I – Dados de frequência reativa de bandas por extrato alcalino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* reconhecidas pelos pacientes dos grupos i, ii e iii.

Banda (KDa)	Grupos						Total		P
	<i>i</i>		<i>ii</i>		<i>iii</i>				
	n	%	n	%	n	%	n	%	
260 a 220	16	80,0	31	77,5	1	3,1	48	52,5	<0,001
210	0	0,0	1	2,5	1	3,1	2	2,2	0,601
204	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
202	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
197	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
193	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
191	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
190	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
189	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
176	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
175 a 160	18	90	3	7,5	1	3,1	22	23,9	<0,001
155	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
150	0	0,0	2	5	0	0,0	2	2,2	0,184
145	0	0,0	0	0	1	3,1	1	1,1	0,344
143	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
133	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
130	7	35	0	0	0	0,0	7	7,6	<0,001
120	6	30	0	0	0	0,0	6	6,5	<0,001
114	0	0,0	6	15	0	0,0	6	6,5	0,005
109	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
108	0	0,0	0	0	1	3,1	1	1,1	0,344
107	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
103 a 95	9	45	2	5	1	3,1	12	13	<0,001
94	0	0,0	2	5	0	0,0	2	2,2	0,184
90 a 85	4	20	0	0	0	0,0	4	4,3	0,002
84	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
76	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
75	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
70	12	60	1	2,5	0	0,0	13	14,1	<0,001
66	11	55	0	0	0	0,0	11	12	<0,001
65	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
64	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
62	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
61	0	0,0	0	0	1	3,1	1	1,1	0,344
59	5	25	0	0	0	0,0	5	5,4	<0,001
58	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
56	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
52	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
49	5	25	0	0	0	0,0	5	5,4	<0,001
44	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432

43	0	0,0	2	5	0	0,0	2	2,2	0,184
39 a 36	20	100	5	12,5	0	0,0	25	27,2	<0,001
34	9	45	0	0	0	0,0	9	9,8	<0,001
31	9	45	0	0	0	0,0	9	9,8	<0,001
26	4	20	0	0	0	0,0	4	4,3	0,002
23 a 20	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
17	0	0,0	2	5	0	0,0	2	2,2	0,184
16	8	40	0	0	0	0,0	8	8,7	<0,001
15	13	65	0	0	0	0,0	13	14,1	<0,001
14	0	0,0	2	5	0	0,0	2	2,2	0,184
12	4	20	1	2,5	0	0,0	5	5,4	0,009

Anexo II – Dados de frequência reativa de bandas por extrato alcalino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* reconhecidas pelos pacientes dos grupos *i*, *ii* e *iii*.

Banda (KDa)	Grupos						Total		P
	<i>i</i>		<i>ii</i>		<i>iii</i>				
	n	%	n	%	n	%	n	%	
260 a 240	12	60,0	11	27,5	0	0,0	23	25,0	<0,001
230	6	30,0	0	0,0	0	0,0	6	6,5	<0,001
210	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
190	13	65,0	0	0,0	0	0,0	13	14,1	<0,001
160 a 150	7	35,0	14	35,0	10	31,3	31	33,7	0,936
123	0	0,0	2	5,0	0	0,0	2	2,2	0,184
110	13	65,0	2	5,0	0	0,0	15	16,3	<0,001
100	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
85	1	5,0	0	0,0	0	0,0	1	1,1	0,213
81	0	0,0	3	7,5	0	0,0	3	3,3	0,077
71 a 68	8	40,0	0	0,0	0	0,0	8	8,7	<0,001
65	4	20,0	0	0,0	0	0,0	4	4,3	0,002
60 a 58	13	65,0	0	0,0	0	0,0	13	14,1	<0,001
55 a 53	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
52 a 51	0	0,0	7	17,5	0	0,0	7	7,6	0,002
49	0	0,0	1	2,5	0	0,0	1	1,1	0,432
43	0	0,0	5	12,5	0	0,0	5	5,4	0,013
42 a 41	7	35,0	0	0,0	0	0,0	7	7,6	<0,001
40 a 37	16	80,0	11	27,5	0	0,0	27	29,3	<0,001
35 a 34	5	25,0	0	0,0	0	0,0	5	5,4	<0,001
31 a 29	6	30,0	0	0,0	1	31,1	7	7,6	<0,001
25	7	35,0	0	0,0	0	0,0	7	7,6	<0,001
21 a 22	10	50,0	0	0,0	2	6,3	12	13,0	<0,001
20 a 19	8	40,0	7	17,5	0	0,0	15	16,3	<0,001
15	14	70,0	6	15,0	1	3,1	21	22,8	<0,001
12	9	45,0	0	0,0	0	0,0	9	9,8	<0,001

10 REFERÊNCIAS

Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal UC. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103:242-6.

Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R, Ikeshiro T. Efficacy of Agar-Plate Culture in Detection of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Journal of Parasitic Diseases*. 1990;76(3):425-8.

Atkins NS, Conway DJ, Lindo JF, Bailey JW, Bundy DA. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. 1999;21(10):517-26.

Bachur TPR, Vale JM, Coêlho ICB, Queiroz TRBS, Chaves CS. Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008;12:115-22.

Bassi GE, Ishiri DK, Ferreira AW, Camargo ME. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano. Considerações sobre o limiar de reatividade. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. 1991;27:49-52.

Barsoum, SR. Parasitic infections in organ transplantation. *Experimental and clinical transplantation*. 2004;2(2):258-67.

Batista MV, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girão ES, Rosa DR, Ianhez LE, Bonazzi PR, Lima AS, Fernandes PF, Pádua-Neto MV, Bacchella T, Oliveira AP, Viana CF, Ferreira MS, Shikanai-Yasuda MA. *Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients*. *Tropical Medicine and International Health*. 2011;16(9):1134-42.

Ben-Youssef B, Baron P. *Strongyloides stercoralis* infection from pancreas allograft. *Transplantation* 2005;80:1997.

Blatt JM, Cantos GA. 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. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2003;7:402–8.

Bonne-Année S, Hess JA, Abraham D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. *Immunologic research*. 2011;51(2-3):205-14.

Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, Degani M, Anselmi M. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007;14:129-33.

Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, Van Den Ende J, Bisoffi Z. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infectious Disease*. 2013;8:13:78.

Castro AZ, Viana JDC, Penedo AA, Donatele DM. Levantamento das parasitoses intestinais em escolares da rede pública na cidade de Cachoeiro de Itapemirim – ES. *NewsLab*, 2004;63:102–5.

Center of Disease Control – CDC Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/strongyloidiasis.htm>> Acesso em 6 de fevereiro de 2014.

Chieffi PP, Chiattoni CS, Feltrim EN, Alves RC, Paschoalotti MA. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in São Paulo City, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95:711–2.

Chokkalingam Mani B, Mathur M, Clauss H, Alvarez R, Hamad E, Toyoda Y, Birkenbach M, Ahmed M. *Strongyloides stercoralis* and Organ Transplantation. *Case reports in transplantation*. 2013;549038.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 1999;3:203–6.

Concha R, Harrington JR W, Rogers AI. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management and determinants of outcome. *Journal Clinical Gastroenterology*. 2005; 39: 203-211.

Conway DJ, Bailey JW, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28 kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;168:784-7.

Conway DJ, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE. *Strongyloides stercoralis*: Characterization of immunodiagnostic larval antigens. *Experimental Parasitology*. 1994;79:99-105.

Corral MA. Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana frente a diferentes frações antigênicas de *Strongyloides venezuelensis*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Rossin IR. Intestinal parasites in AIDS and +HIV patients in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996;91:685–6.

Costa-Cruz JM, Bullamah CB, Gonçalves-Pires Mdo R, Campos DM, Vieira MA. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1997; 39:313-7.

Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DAO, Soplete MC, Campos DMB, Taketomi EA. Heterologous antigen extract in the ELISA for the detections of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2003;45(5):265-8.

Costa-Cruz, JM. *Strongyloides stercoralis*. In: Neves DP et al. *Parasitologia humana*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

Coster LO. Parasitic infections in solid organ transplant recipients. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2013;27(2):395-427.

De Bona S, Basso R. Hyperinfection by *Strongyloides stercoralis* associated with chronic use of corticosteroid. *Revista brasileira de análises clínicas*. 2008;40(4): 247-50.

De Carli GA. Parasitologia Clínica – Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

Del Carpio D, Rodríguez D, Vildósola H. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in a patient with human immunodeficiency virus (HIV) infection: report of a case and review of the literature. *Revista de Gastroenterologia do Peru*. 1995;15(3):290-5.

Devault GA, Jr King JW, Rohr MS, Landrenea UMD, Brown ST, McDonald JC. Opportunistic infections with *Strongyloides stercoralis* in renal transplantation. *Reviews of Infectious Diseases*. 1990;4(4):653-71.

Dias RMD, Mangini ACS, Torres DMAGV, Velloso SAG, Silva MIPG, Silva RM, Corrêa MOA, Coletti C. Ocorrência de *Strongyloides stercoralis* em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1992;34:15–7.

Dreyer G, Fernandes-Silva E, Alves S, Rocha A, Albuquerque R, Addiss D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:2569-71.

Dulley FL, Costa S, Cosentino R, Gamba C, Saboya R. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection after allogeneic stem cell. Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2009;43:741–2.

Fardet L, Génereau T, Poirot JL, Guidet B, Kettaneh A, Cabane J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: Case series and literature review. *Journal of Infection*. 2007;54:18-27.

Feitosa G, Bandeira AC, Sampaio DP, Badaró R, Brites C. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. The Brazilian Strongyloidiasis in Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;5:339–44.

Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MRF, Gonçalves ALR, Rodrigues RM, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;67(2):153-61.

Franco-Paredes C, Jacob JT, Hidron A, Rodriguez-Morales AJ, Kuhar D, Caliendo AM. Transplantation and tropical infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(3):189-96.

Fitzpatrick MA, Caicedo JC, Stosor V, Ison MG. Expanded infectious diseases screening program for Hispanic transplant candidates. *Transplant infectious disease*. 2010;12(4):336-41.

Genta RM, Lillibridge JP. Prominence of IgG4 antibodies in the human response to *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 1989;160(4):692-8.

Girgis NM, Gundra MU, Loke P. Immune Regulation during Helminth Infections. *PLOS Pathog*. 2013;9(4):e1003250.

Gonçalves AL, Nunes DS, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2012;139(7):956-61.

Gonzaga HT, Ribeiro VS, Feliciano ND, Manhani MN, Silva DA, Ueta MT, Costa-Cruz JM. IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunology Letters*. 2011;139(1-2):87-92.

Graeff-Teixeira C, Leite CSM, Sperhake CL, Fassina K, Petry SMG, Mucenic T, Pandolfi C, Barcelos S, Job F. Prospective study of strongyloidosis in patients with hematologic malignancies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997;30:355-57.

Greiner M, Sohr D, Göbel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal Immunology Methods*. 1995;185(1):123-32.

Grove DI, Blair AJ. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981;30:344-9.

Grove DI. Human strongyloidiasis. *Advances in Parasitology*. 1996;38:251-309.

Gryschek RCB, Siciliano RF. Estrongiloidíase. In: VERONESI. Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo. Atheneu, 2005.

Hernandes-Chavarría F. *Strongyloides stercoralis*: um parasito subestimado. *Parasitol al Día*. 2000;25:40-9.

Hirata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N, Fujita J. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77(4):683-4.

Hoy WE, Roberts NJ, Bryson MF, Bowles C, Lee JC, Rivero AJ, Ritterson AL. Transmission of strongyloidiasis by kidney transplant? Disseminated strongyloidiasis in both recipients of kidney allografts from a single cadaver donor. *Journal of the American Medical Association*. 1981;246(17):1937-9.

Inês Ede J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, Silva MP, Teixeira MC, Soares NM. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis

of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in fecal specimens. *Acta Tropica*. 2011;120(3):206-10.

Inês Ede J, Silva MLS, Souza JN, Teixeira MCA, Soares NM. The role glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;76:31-5.

Irimenam N, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagnbenro-Beyioku. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitology International*. 2010;59:9-14.

Issa H, Aljama AM, Al-Salem. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a post-renal transplant patient. *Journal Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2011;4:269–71.

Keiser PB; Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17(1):208–17.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2^a ed. Massachusetts: Blackwell Science, 2006.

Kobayashi J, Hasegawa H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, Sato Y. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1995;37:13-8.

Kobayashi J, Hasegawa H, Soares EC, Forli AA, Toma H, Correia- Dacal AR, Brito MC, Yamanaka A, Sato Y. Studies on prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the agar plate faecal culture method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1996;38(4):279-284.

Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukavat K, Nakamura Y, Tani S, Ieda M, Tomita K, Hattan N, Mori M, Makino S. An evaluation of the agar plate method for the detection of *Strongyloides stercoralis* in northern Thailand. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;93:183-8.

Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N, Kita K, Ohtomo H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;45(4):518-21.

Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2004;23:214-6.

Kotton NC, Lattes R. Parasitic infections in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2009;9(4):S234-51.

Kramme S, Nissen N, Soblik H, Erttmann K, Tannich E, Fleischer PM, Brattig N, Nocht B. Novel real-time PCR for the universal detection 1 of *Strongyloides* spp. *Institute for Tropical Medicine*. 2010;60:454–8.

Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, McAuliffe I, Cajal SP, Won K, Juarez M, Di Paolo A, Tapia L, Acosta N, Lee R, Lammie P, Abraham D, Nutman TB. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;(10):1624-30.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta tropica*. 2014;135:33-43.

Leyva ML, González-Carbajal PM, Cañete VR, Almenarez GZ. Diagnóstico y tratamiento de la estrongiloidosis. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2011;40(2): ISSN 0138-6557.

Lindo JF, Atkins NS, Lee MG, Robinson RD, Bundy DA. Parasite-specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996; 90(6):702-3.

Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1993;37(3):655-82.

Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;93:265-75.

Luna BO, Grasselli R, Ananias M, Pinto ST, Bozza AF, Soares M, Salluh FIJ. Estrongiloidíase Disseminada: Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2007;19(4):463-68.

Lutz A. O *Schistosoma mansoni* e a schistosomatose Segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1919;11:121-55.

Macedo CML, Rey L. Enteroparasitoses em gestantes e puérperas no Rio de Janeiro. *Caderno de Saúde Pública*. 1996;12(3):383-88.

Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires Mdo R, de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. *Experimental Parasitology*. 2001;99(1):52-5.

Machado ER, Ueta MT, Pires MRFG, De Oliveira JBA, Faccioli LH, Costa-Cruz, JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human Strongyloidiasis by enzyme linked immunosorbent assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(6):849-51.

Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros AI, Faccioli LH. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *Journal of immunology*. 2005;175(6):3892-9.

Machado ER, Teixeira EM, Paula FM, Gonçalves- Pires MRF, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Immunoparasitological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in garbage collectors in Uberlândia, MG, Brazil. *Parasitología Latinoamericana*. 2007;62:180-2.

Machado ER, Faccioli LH, Costa-Cruz JM, Lourenço EV, Roque-Barreira MC, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT. *Strongyloides venezuelensis*: The antigenic identity of eight strains for immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Experimental Parasitology*. 2008a;119:7-14.

Machado RE; Teixeira ME; Goncalves-Pires FMR; Loureiro MZ; Araujo AR; Costa-Cruz MJ. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal câncer. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2008b;40:154-8.

Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. *Current Infectious Disease Reports*. 2011;13(1):35-46.

Marty FM. Strongyloides hyperinfection syndrome and transplantation: a preventable, frequently fatal infection. *Transplant infectious disease*. 2009;11(2):97-9.

Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A Role of Mast Cell Glycosaminoglycans for the Immunological Expulsion of Intestinal Nematode,

Strongyloides venezuelensis. *The American Association of Immunologists*. 2000; 164:3749-3754.

Masry HZ, O'Donnell J. Fatal strongyloides hyperinfection in heart transplantation. *Journal of heart and lung transplantation*. 2005;24(11):1980-3.

Mendonça SC, Gonçalves-Pires MRF, Rodrigues RM, Ferreira A JR, Costa-Cruz JM. Is there an association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus? *Acta Tropica*. 2006;99:102–5.

Mineo JR, Silva DAO, Sopoiete MC, Leal GS, Vidigal LH, Tápia LER, Bacchin MI. Medidas de Biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. 1 ed. Uberlândia. EDUFU, 2005.

Monteiro AMC, Silva EF, Almeida KS, Sousa JJN, Mathias LA, Baptista F, Freitas FLC. Parasitoses intestinais em crianças de creches públicas localizadas em bairros periféricos do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropica*. 2009;38:284–290.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. *Revista de Serviços em Saúde Pública*. 1948;1:507-624.

Naves MM, Costa-Cruz JM. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection among the elderly in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013;55:309-13.

National Center for Biotechnology Information – NCBI. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2014.

Neter J, Kurtner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. 4ª ed. Illinois: Richard D. Irwing, 1996.

Neumann I, Ritter R, Mounsey A. *Strongyloides* as a Cause of Fever of Unknown Origin. *Journal of American Board of Family Medicine*. 2012;25:263-5.

Negrão-Corrêa D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001; 43(5):291-9.

Nunes ALB, Cunha AMO, Marçal, O Jr. Coletores de lixo e enteroparasitoses: o papel das representações sociais em suas atitudes preventivas. *Ciência & Educação*. 2006;12:25–38.

O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ, Abraham D. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infection and Immunity*. 2011;79(7):2770-8.

Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes DM, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97:119–21.

Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103:967-972.

Organização Mundial da Saúde. Doenças tropicais negligenciadas. Strongyloidiasis. Genebra: WHO; 2014. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/strongyloidiasis/en/> acesso em 18 de fevereiro de 2014.

Orlent H, Crawley C, Cwynarski K, Dina R, Apperley J. Strongyloidiasis pre and post autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2003;32:115-7.

Palau LA, Pankey GA. *Strongyloides* hyperinfection in a renal transplant recipient receiving cyclosporine: possible *Strongyloides stercoralis* transmission by kidney transplant. *American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;57(4):413-5.

Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*. 2011;138(11):1331-40.

Paula FM, Gottardi M, Corral MA, Chieffi PP, Gryscek RC. Is the agar plate culture a good tool for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in candidates for transplantation? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2013; 55(4).

Pires ML, Dreyer G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1993;48:175-82.

Patel G, Arvelakis A, Sauter BV, Gondolesi GE, Caplivski D, Huprikar S. Strongyloides hyperinfection syndrome after intestinal transplantation. *Transplant Infectious Disease*. 2008;10(2):137-41.

Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Molecular & biochemical parasitology*. 2002;25(1-2):73-81.

Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(e-2002):1-10.

Repetto S, Durán P, Lasala M, González-Cappa S. High rate of strongyloidosis infection out of endemic area in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010; 82:1088–93.

Repetto SA, Alba Soto CD, Cazorla SI, Tayeldin ML, Cuello S, Lasala MB, Tekiel VS, González Cappa SM. An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Tropica*. 2013;126(2):110-4.

Rossi CL, Takahashi EH, Partel CD, Teodoro LGVL, Silva LJ. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993;35:361–5.

Roxby AC, Gottlieb GS, Limaye AP. Strongyloideiasis in transplant patients. *Clinical Infectious Disease* 2009;49:1411-23.

Rodrigues MAM, Fróes RC, Anefalos A, Kobayasi S. Invasive enteritis by *Strongyloides stercoralis* presenting as acute abdominal distress under corticosteroid therapy. *Revista Hospital das Clínicas*. 2001;56(4):0041-8781.

Rodrigues RM, Sopenete MC, Silva DA, Cunha-Júnior JP, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):89-93.

Rodrigues RM, Oliveira MC, Sopenete MC, Silva DAO, Campos DMB, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. IgG1, IgG4 and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitology Research*. 2007;101:1209-14.

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes: modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 1954;53:248-50.

Said T, Nampoory MR, Nair MP, Halim MA, Shetty A, Kumar AV, Mokadas E, Elsayed A, Johny KV, Samhan M, Al-Mousawi M. Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait. *Transplantation Proceedings*. 2007;39(4):1014-5.

Santos MC, Costa-Cruz JM, Carvalho-Neto C, Lima MMR, Cristina M. Enteric parasites and commensals in pregnant women seen at the University Hospital, Federal University of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1998;40:193–6.

Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *International Journal for Parasitology*. 1990;20(1):57–62.

Sato Y, Toma H, Kiyuna S, Shiroma Y. Gelatin particle indirect agglutination test for mass examination for strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;85:515-18.

Sato Y, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;53(3):248-50.

Schaeffer MW, Buell JF, Gupta M, Conway GD, Akhter SA, Wagoner LE. *Strongyloides* Hyperinfection Syndrome after Heart Transplantation: case report and review of the literature. *Journal of heart and lung transplantation*. 2004;23:905-11.

Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R; Pulcheri W. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65, 346–50.

Siddiqui AA, Koenig NM, Sinensky M, Berk SL. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. *Parasitology Research*. 1997;83:655-8.

Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious diseases*. 2001;33:1040-7.

Silva CV, Ferreira MS, Borges AS, Costa-Cruz JM. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2005;37:211–5.

Silva EF, Silva EB, Almeida KS, Sousa JJN, Freitas FLC. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 2009;38:35–43.

Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5):687-91.

Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryschek RC, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2014; 141(5):716-21.

Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. *Revista de Patologia Tropical*. 2006;35:173–84.

Taylor DM, van der Werf N, Maizels MR. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends in Immunology*. 2012;33(4):181–9.

Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;60:967–73.

Valar C, Keitel E, Dal Prá RL, Gnatta D, Santos AF, Bianco PD, Sukiennik TCT, Pegas KL, Bittar AE, Oliveira KT, Garcia VD. Parasitic Infection in Renal Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. 2007;39:460–2.

Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JCFM, Wismans PJ, Sarfati C, Vervoort T, Van Gool T. Use of Enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(2):438-42.

Verweij JJ, Canales M, Polman KZJ, Brienens EA. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103:342-6.

Vilela EG, Clemente WT, Mira RRL, Torres HOG, Veloso LF, Fonseca LP, De Carvalho LR, Fonseca MdC, Franca Lima AS. *Strongyloides stercoralis*

hyperinfection syndrome after liver transplantation: case report and literature review. *Transplant infectious disease*. 2009;11:132-6.

Wirk B, Wingard JR. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant infectious disease*. 2009;11(2):143-8.

Zago-Gomes MP, Aikawa KF, Perazzio SF, Gonçalves CS, Pereira FE. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35:571.

Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A. Strongyloidiasis-progress in diagnosis and treatment. *Internal Medicine*. 2000;39:695-700.

11 APÊNDICES

Apêndice I

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ___ F ___
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ___ F ___
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR *S. stercoralis* EM PACIENTES COM IMUNODEPRESSÃO"
PESQUISADOR: Dr. Ronaldo César Borges Gryscek
CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL nº: 39.680 (CREMESP)
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
 2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
 3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 03 (três) anos
-

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. As informações seguintes estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que tem por objetivo inicial conhecer qual ou quais são os melhores métodos de diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*, sobretudo frente à imunodepressão. O conhecimento das melhores técnicas de diagnóstico da parasitose tem por objetivo reconhecer as pessoas infectadas, sobretudo os indivíduos imunodeprimidos em determinada área e tratá-las, antes do evento doença se agravar, com o objetivo final de eliminar essa doença desse local.
2. Os trabalhos executados pretendem avaliar os indivíduos com relação à infecção por *Strongyloides stercoralis*, através do exame parasitológico, isto é, da busca de larvas do parasito em amostras de fezes; de métodos de imunodiagnóstico, isto é, a detecção de anticorpos presentes no sangue, que

são formados contra o parasito e da detecção do DNA, ou seja, material genético do parasito nas fezes (por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR)). Desses procedimentos, as técnicas de observação das larvas do parasito nas fezes são bem conhecidas, mas não são usadas de forma rotineira nos laboratórios de análises clínicas. Da mesma forma, a pesquisa de anticorpos contra o parasito, também são bem conhecidas, porém não são utilizadas em rotina diagnóstica. Já o processo de identificação do DNA do parasito nas fezes, ainda não é considerado para uso rotineiro, mas já existem estudos conhecidos que utilizaram esses métodos com sucesso. Os casos onde os exames comprovarem uma positividade para *S. stercoralis* serão avaliados e encaminhados para o tratamento que for mais apropriado ao estado clínico do paciente. Esse projeto constitui um avanço na aplicação de técnicas de diagnóstico da estrogiloidíase, uma vez que o diagnóstico através de métodos parasitológico de fezes, não é utilizado na rotina laboratorial, e isso diminui a possibilidade de diagnóstico e conseqüente tratamento precoce da doença, principalmente em condições de imunodepressão, além de permitir a adoção de medidas que possam eliminar a transmissão da parasitose. Deve ficar claro que sua participação é totalmente livre e voluntária e que sua eventual recusa em participar do estudo não ocasionará nenhum tipo de prejuízo pessoal ao (à) Sr(a) e sua família.

3. Sua participação no estudo consiste em:
 - A. Fornecer uma amostra de fezes
 - B. Fornecer uma amostra de sangue (7 mL), através da punção de uma veia periférica no antebraço.
 - C. Concordar em realizar a sorologia para HTLV-1 e HIV, pois estas condições podem alterar os resultados dos métodos imunológicos de diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*.
4. Tais procedimentos não envolvem risco importante à sua saúde. No entanto, a obtenção da amostra de sangue pode ocasionar desconforto em função da picada para a coleta. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.
5. O benefício direto para cada participante individualmente ocorrerá no caso de ser detectada a presença de larvas de *S. stercoralis* nas fezes ou anticorpos contra o mesmo no sangue. Nesse caso o participante será tratado com o remédio adequado. Além disso, poderão ser detectadas outras parasitoses intestinais que também serão tratadas de forma adequada. O maior benefício será, no entanto, para todos os imunodeprimidos, pois a verificação da melhor forma de diagnosticar os doentes permitirá o seu tratamento precoce e evitará a possibilidade de agravamento da parasitose.
6. Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.
7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek que poderá ser encontrado no Laboratório de Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, na A. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 500, prédio II, 2º andar, telefone 11- 3061-8220. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º andar – telefone 11 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20; FAX 11 3069-6442 ramal 26 – email: cappesq@hcnet.usp.br
8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento, se for o caso.
9. Direito de confidencialidade – as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
10. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados. Os resultados dos exames serão fornecidos individualmente aos pacientes durante seu acompanhamento ambulatorial. Se consentido, os dados dos exames constarão nos prontuários dos pacientes para o acompanhamento da rotina ambulatorial.
11. Despesas e compensações: não há nenhuma espécie de despesa pessoal para o participante em qualquer fase deste estudo, incluindo exames e remédios que venham a ser indicados no tratamento de alguma parasitose identificada. Da mesma forma não há compensação financeira relacionada à

sua participação. Caso surja alguma despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12. Solicitamos também sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR *S. stercoralis* EM PACIENTES COM IMUNODEPRESSÃO"

Eu discuti com o Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryschek sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou também claro que a minha participação é isenta de despesas.. Concordo voluntariamente a participar desse estudo e estou ciente que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente / representante legal

São Paulo, _____ de 2012.

Assinatura de testemunha, para casos de participantes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

São Paulo, _____ de 2012.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo

Dr. Ronaldo César Borges Gryschek

Apêndice II

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

A

Moléstias Infecciosas e Parasitárias

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 06.03.13 a execução do subprojeto intitulado "**Imunodiagnóstico de Strongyloides stercoralis em pacientes candidatos a transplante**", que será dissertação de mestrado da aluna **Maiara Gottardi**, tendo como orientador o **Dr. Ronaldo César Borges Gryschek**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0123/10**, intitulado "**INVESTIGAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR S. stercoralis EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS DE IMUNODEPRESSÃO**", aprovado por esta CAPPesq em 24.03.10.

CAPPesq, 07 de Março de 2013.

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Apêndice III **TERMO DE ANUÊNCIA**

São Paulo, 03 de setembro de 2012

À Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Fomos informados previamente e estamos de acordo com a execução do projeto intitulado "Investigação de técnicas diagnósticas para identificação da infecção por *S. stercoralis* em pacientes com diferentes formas de imunodepressão", aprovado pela FAPESP (2010/51110-2) e pela Comissão de Ética e Pesquisa HC-FM/USP (0123/10). Dentro desse projeto, está incluído um subprojeto intitulado "Imunodiagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em pacientes candidatos a transplante".

Atenciosamente,

Prof. Dr. William Carlos Nêdas
Professor Titular de Urologia
Chefe do Serviço de Transplante Renal

Apêndice IV **TERMO DE ANUÊNCIA**

São Paulo, 23 de outubro de 2012

À Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Fomos informados previamente e estamos de acordo com a execução do projeto intitulado "Investigação de técnicas diagnósticas para identificação da infecção por *S. stercoralis* em pacientes com diferentes formas de imunodepressão", aprovado pela FAPESP (2010/51110-2) e pela Comissão de Ética e Pesquisa HC-FM/USP (0123/10). Dentro desse projeto, está incluído um subprojeto intitulado "Imunodiagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em pacientes candidatos a transplante".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque
CRM 22.761
Professor Titular
Transplante e Cirurgia do Fígado - HC FMUSP

Apêndice V

TERMO DE ANUÊNCIA

São Paulo, 23 de outubro de 2012

À Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Fomos informados previamente e estamos de acordo com a execução do projeto intitulado "Investigação de técnicas diagnósticas para identificação da infecção por *S. stercoralis* em pacientes com diferentes formas de imunodepressão", aprovado pela FAPESP (2010/51110-2) e pela Comissão de Ética e Pesquisa HC-FM/USP (0123/10). Dentro desse projeto, está incluído um subprojeto intitulado "Imunodiagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em pacientes candidatos a transplante".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley
Chefe do Transplante de Medula Óssea
HC-FMUSP
CRM: 33.842

Apêndice VI

Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo
55(4):291, July-August, 2013
doi: 10.1590/S0036-46652013000400013

LETTER TO THE EDITOR

IS THE AGAR PLATE CULTURE A GOOD TOOL FOR THE DIAGNOSIS OF *Strongyloides stercoralis* IN CANDIDATES FOR TRANSPLANTATION?

São Paulo, April 2, 2013

Dear Editor,

Strongyloides stercoralis, causes strongyloidiasis, a chronic infection that is often asymptomatic or minimally symptomatic. Autoinfection cycles in the normal host can progress to a hyperinfection syndrome and dissemination that leads to severe illness and death in the immunocompromised host^{2,5}.

Identification and treatment of chronic strongyloidiasis is the most important factor for avoiding the severe form, particularly in transplant candidates, in whom immunosuppressive therapy (including the use of corticosteroids) is a risk factor for the occurrence of severe disease⁴. Definitive diagnosis of strongyloidiasis is usually made through detection of the larvae in stool samples, which have low sensitivity⁶. Agar Plate culture is considered more efficient than other conventional methods in the parasitological diagnosis of *S. stercoralis* with high sensitivity^{1,3}. However, it has not been used to screen candidates for transplantation.

The objective of this study was to verify the use of the Agar Plate culture method to diagnose *S. stercoralis* in candidates for transplantation. Therefore, feces samples from a population of 150 candidates for transplants (kidney, liver and bone marrow) were analyzed by spontaneous sedimentation, Rugai and Agar Plate culture methods, after signing a term of informed consent. The study was approved by the local Ethics Research Committee (protocol 0123/10).

Our observations confirmed that 9.33% (14/150) of the candidates for transplantation were positive for *S. stercoralis* based on three parasitological diagnostic techniques. The Agar Plate culture alone or combined with other techniques detected 71.43% (10/14) of cases positive for *S. stercoralis*, corresponding to 6.67% (10/150) of the candidates for transplantation (Table 1).

Table 1

Detection of *Strongyloides stercoralis* using parasitological methods alone and in combination, in 150 stool samples from candidates for transplantation

Groups	SS	R	APC	SS+R	SS+APC	R+APC	SS+R+APC	Total
Renal transplan- tation	0	2	5	0	1	1	0	9
Liver transplan- tation	2	0	0	0	0	0	1	3
Bone Marrow Transplant	0	0	0	0	1	0	1	2
Total	2	2	5	0	2	1	2	14

SS, spontaneous sedimentation method; R, Rugai method; APC, Agar Plate culture method.

Reports in the literature show that the analysis of a single stool sample has a sensitivity of only 15-30%; however, sensitivity increases to nearly 100% when seven consecutive daily stool specimens are examined⁷.

Given the inconvenience in collecting large numbers of samples, we suggest an evaluation using only one sample, in which a combination of three parasitological diagnostic techniques is used.

This study demonstrated the high sensitivity of Agar Plate culture for diagnosing strongyloidiasis, especially when combined with other techniques to diagnose *S. stercoralis*, which indicates that it can be used to screen candidates awaiting transplantation.

Fabiana Martins de PAULA(1)

Maiara GOTTARDI(1)

Marcelo Andreetta CORRAL (1)

Pedro Paulo CHIEFFI(1,2)

Ronaldo Cesar Borges GRYSCHER(1)

(1) Laboratório de Investigação Médica, LIM-06,
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

(2) Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa,
São Paulo, SP, Brazil.

Correspondence to: Fabiana Martins de Paula.
Laboratório de Investigação Médica (LIM06),
Instituto de Medicina Tropical, prédio II, 2º andar,
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470,
05403-000, São Paulo, SP, Brasil.
Tel: +55 11 3061-8220; Fax: +55 11 3064 5132.
E-mail: fabiana.paula@hc.fm.usp.br.

REFERENCES

1. Inês EJ, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva MLS *et al.* Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop.* 2011;120:206-10.
2. Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microb Rev.* 2004;17:208-17.
3. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhvat K, Ieda M, Takatsuka N, *et al.* A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:518-21.
4. Marcos LA, Terashima A, Dupont HL, Gotuzzo E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:314-8.
5. Roxby AC, Gottlieb GS, Limaye AP. Strongyloidiasis in transplant patients. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1411-23.
6. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1040-7.
7. Upanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:967-73.