

AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS DE *STRONGYLOIDES STERCORALIS* PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE

Cláudio Lúcio Rossi, Emília Emiko Hieda Takahashi, Angela Lauand
Sampaio Teixeira, Sílvia de Barros-Mazon e Rose Clélia Grion Trevisan

Preparações antigênicas de Strongyloides stercoralis para o imunodiagnóstico da estrongiloidíase têm sido tradicionalmente obtidas pela extração de antígenos do parasita com solução salina. No presente trabalho, após obtenção da preparação antigênica de S. stercoralis com extração salina, a fração residual foi solubilizada com uréia, e as duas preparações foram avaliadas para o imunodiagnóstico da estrongiloidíase, através de uma técnica imunoenzimática. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas preparações, em termos de atividade antigênica específica e reatividade cruzada. A dificuldade de obtenção de larvas de S. stercoralis tem sido um fator limitante para o desenvolvimento de reações mais sensíveis e específicas que possam ser empregadas no imunodiagnóstico da estrongiloidíase. A possibilidade de um maior rendimento, em termos de material antigênico ativo, abre perspectivas de fracionamento do extrato bruto do parasita, na tentativa de se encontrar frações com maior atividade antigênica específica e menor reatividade cruzada.

Palavras-chaves: Strongyloides stercoralis. Estrongiloidíase. Imunodiagnóstico. Antígenos.

Strongyloides stercoralis é um parasita com distribuição geográfica mundial, tendo maior prevalência em países tropicais⁵. A maioria dos indivíduos com estrongiloidíase é assintomática ou apresenta manifestações clínicas brandas, não patognômicas^{2,9}.

O diagnóstico de estrongiloidíase tem sido tradicionalmente feito por métodos parasitológicos baseados na identificação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes dos indivíduos infectados. Entretanto, muitos autores têm ressaltado a falta de sensibilidade desses métodos^{8,10}.

O desenvolvimento de testes sorológicos confiáveis para o diagnóstico da estrongiloidíase pode ter grande utilidade em situações epidemiológicas e clínicas. Até o presente momento, poucas tentativas têm sido feitas para o

desenvolvimento desses testes^{1,6,11,13,14,15}. Tradicionalmente, preparações antigênicas de *S. stercoralis*, resultantes de extração de antígenos com solução salina, têm sido utilizadas nas técnicas sorológicas padronizadas. Todavia, tais preparações carecem de adequada sensibilidade e especificidade, por representarem extratos brutos do parasita. Uma das principais limitações encontradas no desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos, é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de antígenos que permitam seu posterior fracionamento e análise.

Estudos prévios têm mostrado que, após a extração de antígenos de *Schistosoma mansoni* com solução salina, a fração residual do parasita solubilizada com uréia, pode apresentar quantidades significativas de materiais antigênicos ativos^{16,17}.

No presente trabalho, após obtenção de uma preparação antigênica de *S. stercoralis* com extração salina, uma segunda preparação antigênica foi obtida pela solubilização da fração residual com uréia, e as duas preparações foram avaliadas para o imunodiagnóstico da estrongiloidíase, através de uma técnica imunoenzimática (ELISA).

Trabalho realizado no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Endereço para correspondência: Dr. Cláudio Lúcio Rossi, Depto. de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP. CP: 6111, 13081-970 Campinas, SP.

Recebido para publicação em 30/12/92.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Quando não especificado no texto, os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO. Tris (hidroximetil) - amino metano (Tris) e peróxido de hidrogênio a 30% (H_2O_2) foram obtidos da Aldrich Co., Milwaukee, WI.

Preparação dos antígenos de *S. stercoralis*

Larvas de *S. stercoralis* recuperadas de cultura de fezes com carvão, através de uma modificação do método de Baermann¹², foram lavadas várias vezes por centrifugação e estocadas a $-70^\circ C$ até o momento de uso. A preparação antigênica resultante da extração salina foi obtida segundo Gam, Neva e Krotoski³. Resumidamente, as larvas foram descongeladas e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato 0,15M, pH 7,2 (SST), contendo 5mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (FFMS). Após fragmentação das larvas por sonicação (2,5min), o material foi deixado sob agitação lenta, a $4^\circ C$, durante 18h, para a extração de antígenos. Após centrifugação a 32.000 xg, durante 30 min, a $4^\circ C$, o sobrenadante (preparação ES) foi cuidadosamente removido, alíquotado e estocado a $-70^\circ C$. O precipitado, resultante da centrifugação, foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 0,05M, contendo uréia 8M e FFMS 5mM, pH 8. O material foi sonicado como previamente descrito e deixado sob agitação lenta, a $4^\circ C$, durante 2h. Após centrifugação a 32.000xg, por 30 min, a $4^\circ C$, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e submetido a cromatografias de exclusão em colunas PD-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), equilibradas com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8, contendo 0,2M de NaCl. O eluente contendo proteínas (preparação EU) foi alíquotado e estocado a $-70^\circ C$.

ELISA

A técnica imunoenzimática utilizada neste trabalho foi adaptada a partir de uma técnica previamente descrita para a detecção de anticorpos específicos da classe IgG anti-*S. stercoralis*¹¹. As concentrações protéicas das preparações antigênicas,

bem como a concentração ótima do conjugado, selecionadas para uso, foram determinadas previamente através de ensaios de titulação em placas de ELISA. Placas de poliestireno com orifícios de fundo chato (Corning, New York) foram recobertas com 200 μ l/orifício das preparações EU ou EU, diluídas a 4 μ g de proteína/ml com tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Após incubação por 3h, a $37^\circ C$, as placas foram lavadas três vezes com SST contendo 0,1% de Tween 20 (SST/Tw). A seguir, 200 μ l das amostras dos soros diluídas em SST-Tw contendo 0,1% de albumina bovina sérica, foram adicionados aos orifícios. Após incubação por 1h, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com SST-Tw como previamente descrito. Duzentos microlitros do conjugado, imunoglobulina de cabra anti-IgG humana marcada com peroxidase, diluído a 1:750 com SST-Tw, foram adicionados aos orifícios e as placas foram deixadas em repouso por 1h, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com SST-Tw, como já descrito, e 200 μ l do sistema substrato foram adicionados aos orifícios. O sistema substrato era composto de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina e H_2O_2 nas concentrações finais de 0,42mM e 0,004%, respectivamente. Trinta minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 50 μ l de H_2SO_4 4N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450nm em uma leitora de placas. Todas as diluições dos soros foram testadas em triplicata e a densidade ótica (D.O.) média foi considerada. Todas as placas continham 8 replicatas do controle de antígeno. A D.O. final para cada diluição do soro foi determinada, subtraindo-se a média das D.O. dos 8 controles de antígenos. Um resultado foi considerado positivo, quando a D.O. final foi superior a 2 desvios-padrões (DP) acima da média de um grupo de soros negativos, obtidos de 12 indivíduos sem nenhuma evidência de estrongiloidíase, testados na mesma placa.

Soros

Os seguintes grupos de soros, provenientes de indivíduos infectados, foram utilizados: *Strongyloides stercoralis* (n=17); *Ascaris lumbricoides* (n=3); *Schistosoma mansoni* (n=3); *Giardia lamblia* (n=3); *Hymenolepis nana* (n=2);

Enterobius vermicularis (n=2); *Taenia sp* (n=2). O diagnóstico, em todos os grupos, foi determinado por meios parasitológicos. Em todos os casos, nenhuma infecção simultânea com outros parasitas intestinais foi observada, em pelo menos três exames de fezes consecutivos.

Um pool de soros reagentes para *S. stercoralis* foi obtido, misturando-se partes iguais de soros de indivíduos com estrogiloidíase, comprovada por meios parasitológicos e sorologia positiva para o parasita.

Os soros controles negativos foram obtidos de estudantes da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e de funcionários do nosso Departamento. Estes indivíduos tinham, pelo menos, três exames protoparasitológicos negativos e não tinham história passada de infecção por *S. stercoralis*.

RESULTADOS

Em termos de concentração de proteínas, a proporção entre as extrações com SST e uréia foi de 1,7:1.

As atividades antigênicas específicas das

preparações ES e EU foram avaliadas, através de ELISA, utilizando os soros de indivíduos com estrogiloidíase diluídos a 1:10. Dos 17 soros testados, 13 foram reagentes com as duas preparações, 1 foi reagente com a preparação ES e duvidoso com a preparação EU e 3 não reagiram com as duas preparações. Um pool de 8 soros de indivíduos com estrogiloidíase e com sorologia positiva para *S. stercoralis* também foi testado por ELISA com as duas preparações. As densidades óticas finais das reações entre as preparações ES e EU e o pool de soros diluídos a 1/100 foram, respectivamente, 0,75 e 0,74.

A reatividade dos soros de indivíduos portadores de outras infecções parasitárias com as preparações ES e EU é mostrada na Tabela 1. Estes soros foram testados com diluições seriadas, começando em 1/10. Dos 15 soros testados, somente 2 reagiram com as duas preparações antigênicas. Estes eram provenientes de um indivíduo com esquistossomose e de um com ascaridíase. Nestes soros falso-positivos, não foram observadas diferenças significativas entre os títulos de ELISA obtidos com as preparações ES e EU.

Tabela 1 - Avaliação da reatividade entre preparações antigênicas de *S. stercoralis* e soros de indivíduos portadores de infecções heterólogas, através de ELISA.

nº caso	Tipo de infecção	Títulos de ELISA ^A	
		ES ^B	EU ^C
1	<i>A. lumbricoides</i>	80	40
2		< 10	< 10
3		< 10	< 10
4	<i>S. mansoni</i>	20	10
5		< 10	< 10
6		< 10	< 10
7	<i>G. lamblia</i>	< 10	< 10
8		< 10	< 10
9		< 10	< 10
10	<i>H. nana</i>	< 10	< 10
11		< 10	< 10
12	<i>E. vermicularis</i>	< 10	< 10
13		< 10	< 10
14	<i>Taenia sp</i>	< 10	< 10
15		< 10	< 10

^A Títulos foram expressos como as recíprocas das diluições dos soros.

^B Preparação antigênica de *S. stercoralis* obtida com extração salina.

^C Preparação antigênica obtida com solubilização pela uréia da fração residual de *S. stercoralis* resultante da extração salina.

DISCUSSÃO

O diagnóstico definitivo de estrogiloidíase é dado, pelo achado de larvas de *S. stercoralis* nas fezes de pessoas infectadas. Entretanto, as larvas do parasita podem estar presentes em pequenas quantidades, ou mesmo ausentes dos materiais examinados, de modo que vários autores têm salientado a falta de sensibilidade dos métodos parasitológicos^{7 10}. As técnicas sorológicas, principalmente as imunoenzimáticas, podem ser uma boa alternativa para o diagnóstico da estrogiloidíase. A maioria dos trabalhos realizados, até o presente momento, indica que a sensibilidade das técnicas imunoenzimáticas para detecção de anticorpos específicos da classe IgG anti-*S. stercoralis* é próxima a 85%^{13 11}. A dificuldade de obtenção de larvas de *S. stercoralis* e, conseqüentemente, a obtenção de quantidades suficientes de material antigênico ativo, tem sido um fator limitante para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase⁵.

Trabalhos prévios têm mostrado que antígenos ligados à membrana de parasitas podem ser solubilizados na presença de uréia^{16 17}. Os resultados do presente trabalho mostraram que a fração residual de *S. stercoralis*, resultante da extração salina, após solubilização com uréia, apresentou quantidades significativas de material antigênico ativo. As preparações antigênicas ES e EU parecem ter grau similar de reatividade cruzada com soros de indivíduos portadores de infecções heterólogas. Particularmente importante foi a forte reatividade observada com o soro de um indivíduo com ascariíase. Essa reatividade cruzada também tem sido observada por outros autores, utilizando preparações antigênicas de *S. stercoralis* ou *S. ratti*^{4 10 15}.

A sensibilidade e a especificidade de uma técnica imunológica dependem, em grande parte, da preparação antigênica utilizada. A possibilidade de um maior rendimento de material antigênico de *S. stercoralis*, através de um segundo processo de extração, com uréia, abre perspectivas para o fracionamento do extrato bruto do parasita, na tentativa de se encontrar frações com maior atividade antigênica específica e menor reatividade cruzada.

SUMMARY

Aqueous-soluble (AS) antigens from larvae of Strongyloides stercoralis, extracted with phosphate-buffered saline, are traditionally used for serodiagnosis of strongyloidiasis. To identify sources of antigens for use in serodiagnosis, residual particulates from parasite larvae after aqueous extraction were solubilized with Tris-buffered 8M urea, yielding a urea-soluble (US) antigen fraction. Both AS and US antigens from S. stercoralis were evaluated by an enzyme-linked immunosorbent assay. No significant differences were observed between AS and US antigens from the parasite regarding specific antigenic activity and cross-reactivity. Immunoassays are highly dependent on the antigen for sensitivity and specificity. Crude extracts from S. stercoralis should be further studied, mainly in relation to antigenic fractions which could provide even more sensitive and specific results. Studies of fractionation of S. stercoralis must take into account the antigen yield of both the crude extract and fractions, since larvae of parasite are normally difficult to obtain. Considering this aspect, the results from this study are very useful, since the extraction with urea substantially increased the amounts of antigenic materials normally obtained with the classical aqueous extraction.

Key-words: Strongyloides stercoralis. Strongyloidiasis. Immunodiagnosis. Antigens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carroll SM, Karthigasu KT, Grove DI. Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75:706-709, 1981.
2. Carvalho-Filho E. Strongyloidiasis. Clinics in Gastroenterology 7:179-200, 1978.
3. Gam AA, Neva FA, Krotoski WA. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. American Journal of Tropical Medicine 37:157-161, 1987.
4. Genta RM. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. American Journal of Clinical Pathology 89:391-394, 1988.
5. Genta RM. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. Reviews of

- Infectious Diseases 11:755-767, 1989.
6. Genta RM, Weil GJ. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. *Laboratory Investigation* 47:87-90, 1982.
 7. Grove DI. Strongyloidiasis in Allied ex-prisoners of war in South-East Asia. *British Medical Journal* 280:598-601, 1980.
 8. Grove DI, Blair J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:344-349, 1981.
 9. Milder JE, Walzer PD, Kilgore G, Rutherford I, Klein M. Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. *Gastroenterology* 80:1481-1488, 1981.
 10. Neva FA. Biology and immunology of human strongyloidiasis. *Journal of Infectious Diseases* 153:397-407, 1986.
 11. Neva FA, Gam AA, Burke J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. *Journal of Infectious Diseases* 144:427-432, 1981.
 12. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes; modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 14:5-8, 1954.
 13. Sato Y, Ryumon I. Gelatin particle indirect agglutination test for serodiagnosis of human strongyloidiasis. *Japanese Journal of Parasitology* 39:213-219, 1990.
 14. Sato Y, Takara M, Otsuru M. Detection of antibodies in strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79:51-55, 1985.
 15. Tribouley-Duret J, Tribouley J, Appriou M, Megraud RN. Application du test ELISA au diagnostic de la strongiloidose. *Annales de Parasitologie* 53:641-648, 1978.
 16. Tsang VCW, Tao Y, Maddison SE. Systematic fractionation of *Schistosoma mansoni* urea-soluble egg antigens and their evaluation by the single-tube, kinetic-dependent, enzyme-linked, immunosorbent assay (k-ELISA). *Journal of Parasitology* 67:340-350, 1981.
 17. Tsang VCW, Tsang KR, Hancock K, Kelly MA, Wilson BC, Maddison SE. *Schistosoma mansoni* adult microsomal antigens, a serologic reagent. I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components. *Journal of Immunology* 130:1359-1365, 1981.