

## OBSERVAÇÕES SÓBRE A REAÇÃO INTRADÉRMICA COM ANTÍGENO DE *STRONGYLOIDES RATTI* EM PACIENTES COM ESTRONGILOIDOSE

J. PELLEGRINO, G. CHAIA e J. M. Pompeu MEMORIA

### RESUMO

Foi preparado um extrato de larvas filariformes de *Strongyloides ratti* em solução de Coca mertiolatada e foi estudado o comportamento da reação intradérmica, com êste antígeno, em 30 pacientes com estrongiloidose. O antígeno foi utilizado em três diferentes concentrações contendo 40, 4 e 0,4  $\mu\text{g}$  de N por ml. Foi constatada uma relação linear entre o logaritmo das concentrações do antígeno e as áreas médias das pápulas. Foi sugerido que para o estudo dos diversos fatores que podem influir nos resultados da reação intradérmica com antígeno de *S. ratti* bem como para avaliação do valor diagnóstico, o antígeno deva ser utilizado em concentração tal que contenha cêrca de 40  $\mu\text{g}$  de N por ml.

### INTRODUÇÃO

Em 1925, FÜLLEBORN<sup>4</sup> mostrou que pacientes com estrongiloidose apresentam uma sensibilização cutânea específica que pode ser evidenciada por meio de testes por escarificação com larvas dessecadas e pulverizadas de *Strongyloides stercoralis*. No ano seguinte, o mesmo autor (FÜLLEBORN<sup>3</sup>) apresentou os resultados de observações feitas em 11 pacientes (10 com exame positivo para largas de *S. stercoralis* e um caso suspeito de infecção por êste helminto): em 4, as reações foram fracamente positivas (+) e, em 7, fortemente positivas (+++ e ++++). O antígeno para as provas de escarificação foi preparado com larvas filariformes de *S. stercoralis*, lavadas em solução de bicloreto de mercúrio a 1:1.000 e em seguidas dessecadas. Em 28 indivíduos não infectados pelo *S. stercoralis*, incluindo vários casos com infecção ativa ou extinta pelo *Ascaris lumbricoides*, as reações foram negativas. Segundo FÜLLEBORN, um teste cutâneo com antígeno de *S. stercoralis*, quando positivo, teria significado diagnóstico de estrongiloidose ativa ou extinta.

BRANNON & FAUST<sup>2</sup> estudaram o comportamento da reação intradérmica com antígeno preparado com larvas filariformes de *Strongyloides*, provàvelmente *S. jülleborni*, obtidas pela cultura de fezes eliminadas por chipanzês (*Pan satyrus*) naturalmente infectados. As larvas filariformes foram suspensas em solução de Coca contendo 0,4% de fenol e em seguida trituradas em gral de ágata com pó de esmeril estéril. Após extração à temperatura ambiente por 24 horas, seguida de igual período a 37°C, a suspensão foi filtrada em Seitz e depois dessecada sob vácuo em dessecador contendo ácido sulfúrico. O resíduo sêco foi pesado e dissolvido em água destilada estéril de modo a corresponder a uma concentração de 1:100. A reação intradérmica praticada com êste antígeno foi positiva em 23 de 25 pacientes com estrongiloidose; em 4 casos de estrongiloidose extinta a reação intradérmica foi positiva em 2. Como contrôlo, a reação foi praticada em 108 indivíduos com exames de fezes negativo para *S. stercoralis* e sem história de infecção por êste

Instituto Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte e Instituto de Biologia, Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais, Brasil.

helminto. A reação foi positiva em apenas 3 casos: um apresentava infecção por ancilostomídeo e *Trichocephalus* e nos dois restantes o exame de fezes havia sido negativo para helmintos. Concluíram os autores que o teste cutâneo por êles praticado era altamente específico para a infecção pelo *S. stercoralis*.

O *Strongyloides ratti* Sandground, 1925 é um helminto de ratos silvestres: infecta facilmente o rato branco e pode ser mantido no laboratório sem dificuldades. Larvas filariformes podem ser obtidas em grande número a partir de culturas de fezes de animais infectados, o que torna extremamente simples o preparo de antígeno para reação intradérmica.

#### MATERIAL E MÉTODOS

CASOS DE ESTRONGILOIDOSE — A reação intradérmica foi praticada em 30 pacientes adultos do sexo masculino, com idades compreendidas entre 21 e 38 anos e com exame de fezes positivo para larvas de *S. stercoralis*.

Oito pacientes adultos do sexo masculino, com 5 exames de fezes negativos para larvas de *S. stercoralis* (método de Baermann), serviram como controle.

ANTÍGENO — Ratos jovens, pesando cerca de 50 g, foram infetados, por via subcutânea, com 2.000 larvas filariformes de *S. ratti*. Dez a 15 dias depois da infecção, as gaiolas onde estavam os animais infectados foram colocadas sôbre bandejas esmaltadas forradas com papel absorvente umedecido e deixadas até o dia seguinte para que as fezes pudessem ser colhidas sem excessivo dessecação. Depois de colhidas, as fezes foram misturadas com igual quantidade de carvão animal granulado, previamente umedecido. Mantendo-se a mistura em lugar escuro, à temperatura ambiente (cerca de 20°C), larvas filariformes podem ser observadas após 48-72 horas, movendo-se ativamente sôbre a superfície da cultura. O isolamento das larvas filariformes para o preparo do antígeno foi feito pelo método de BAERMANN<sup>1</sup> utilizado para o isolamento de larvas de nematóides do solo. Para isso,

foram utilizados funis de vidro com 250 ml de capacidade contendo água aquecida a 40°C. A cultura era colocada sôbre um pedaço de morim e em seguida transferida para o funil de modo a alcançar o nível da água. Esta operação era facilitada pela interposição de uma tela metálica entre o morim e a água. As larvas filariformes migram ativamente para a água aquecida e podem ser vistas a olho nu, com iluminação oblíqua, ou com o auxílio de uma lente. As larvas foram concentradas por simples sedimentação. Após lavagens sucessivas em água destilada estéril, as larvas concentradas em pequeno volume líquido foram transferidas para empolas e em seguida liofilizadas.

O antígeno utilizado no presente trabalho foi preparado da seguinte maneira: 12 mg de larvas filariformes (*S. ratti*) liofilizadas foram trituradas em gral com areia lavada e esterilizada. Em seguida, foram adicionados 12 ml de solução de Coca mertiolatada a 1:5.000 e a suspensão foi transferida para um frasco contendo pérolas de vidro. A extração foi feita na geladeira (4 a 6°C) por 3 dias, agitando-se freqüentemente o frasco. A suspensão foi finalmente centrifugada a 3.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante (concentração 1:1.000 em relação ao peso das larvas liofilizadas) foi usado como antígeno depois de tinalizado. A determinação do azôto total foi feita pelo método de Koch-McMeekin com "nesslerização" direta (KOCH & HANKE<sup>5</sup>).

O antígeno de *S. ratti* foi usado em três concentrações diferentes: 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000, contendo, respectivamente, 40,4 e 0,4 µg de N total por ml. As diversas diluições do antígeno foram feitas com solução de Coca mertiolatada.

Reação intradérmica — As reações intradérmicas foram feitas na parte média da face flexora do antebraço, tendo-se injetado 0,05 ml de cada diluição do antígeno e da solução controle (Coca mertiolatada) em todos os 30 pacientes com estrongiloidose, com seringa BD de 0,25 ml, munida de agulha BD-27. Foi feita prévia casualização em relação às diluições do antígeno, solução controle e locais dos antebraços.

As áreas das pápulas foram determinadas nos decalques tomados em papel absorvente, ligeiramente umedecido, após delimitação de seu contorno a tinta, 15 minutos após a injeção intradérmica (PELLEGRINO & MACE-DO<sup>6</sup>).

*Análise estatística* — Constatou-se a análise estatística do estudo da regressão linear das áreas médias das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações do antígeno.

RESULTADOS

Os resultados obtidos acham-se resumidos nos Quadros I e II e na Fig. 1. Com o antígeno usado na maior concentração (1:1.000, contendo 40 µg de N por ml), em 93,3% das reações a área das pápulas foi de 1,0 cm<sup>2</sup> ou mais (Fig. 2). Na concentração imediatamente inferior (4 µg N/ml), 60% das reações corresponderam a pápulas de 1,0 cm<sup>2</sup> ou mais e, com o antígeno a 1:100.000 (0,4 µg N/ml), todas as reações tiveram áreas inferiores a 1,0 cm<sup>2</sup>. Com esta última concentração do antígeno, os resultados se aproximaram daqueles obtidos com a solução controle (Coca mertiolatada a 1:5.000).

Nos 8 indivíduos tomados como controle (5 exames de fezes negativos para larvas de *S. stercoralis* usando-se o método de Baermann) o teste cutâneo com o antígeno de

*S. ratti* a 1:1.000 (40 µg N/ml) deu pápulas sempre com áreas inferiores a 0,9 cm<sup>2</sup>. A área média foi de 0,47 cm<sup>2</sup>.

QUADRO II

Áreas médias das pápulas (cm<sup>2</sup>) obtidas em 30 pacientes com estrogiloidose 15 minutos após a injeção de 0,05 ml de cada diluição do antígeno de *S. ratti* e da solução controle (Coca mertiolatada)

Concentração do antígeno (µg N/ml)	Área média das pápulas (cm <sup>2</sup> )
40,0	1,60
4,0	0,99
0,4	0,51
Contrôle (sol. de Coca mertiolatada)	0,48

Erro padrão das médias = ± 0,05

A Fig. 1 mostra a existência de uma relação linear entre os logaritmos das concentrações do antígeno de *S. ratti* e as áreas médias das pápulas. A equação da reta de regressão, obtida pelo método dos mínimos quadrados, foi a seguinte:

$$\hat{y} = 0,70 + 0,55x$$

QUADRO I

Resultados das reações intradérmicas feitas com o antígeno de *S. ratti* e com a solução controle em 30 pacientes com estrogiloidose

Concentração do antígeno (µg N/ml)	Áreas das pápulas (cm <sup>2</sup> )		
	≤ 0,9	1,0-1,1	≥ 1,2
40,0	2 ( 6,7%)	4 (13,3%)	24 (80,0%)
4,0	12 ( 40,0%)	10 (33,3%)	8 (26,7%)
0,4	30 (100,0%)	—	—
Contrôle (sol. de Coca mertiolatada)	30 (100,0%)	—	—

A análise de variância revelou que o desvio da linearidade não foi estatisticamente significativo.

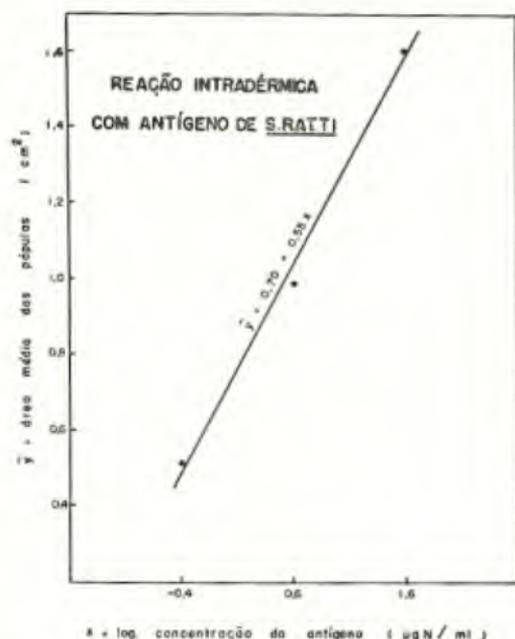


Fig. 1 — Regressão linear da área média das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações do antígeno.

#### DISCUSSÃO

A observação de que existe uma relação linear entre o logaritmo das concentrações do antígeno de *S. ratti* e as áreas médias obtidas, dentro do limite das concentrações utilizadas, indica que, como na esquistossomose (PELLEGRINO, MEMORIA & MACEDO<sup>8</sup>), também na estrongiloidose a reação intradérmica pode ser encarada sob um aspecto quantitativo. Isto possibilitará o estudo da influência de diversos fatores sobre os resultados da reação intradérmica (idade, sexo, cor, local da reação, etc.), como foi feito na esquistossomose mansoni (PELLEGRINO & MEMORIA<sup>7</sup>). Entretanto, a análise dos dados obtidos indica que, embora tenha sido constatada uma relação linear entre o logaritmo da dose e a reação cutânea média, nos limites de concentração do antígeno compreendidos entre 0,4 a 40 µg N/ml ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$ ), a resposta foi pouco evidente com o antígeno contendo 4 µg de N/ml ( $10^{-4}$ ) e semelhante à resposta obtida com a solução controle quando o antígeno foi empregado na concentração correspondente a 0,4 µg N/ml ( $10^{-5}$ ). Recomenda-se, portanto, que para o estudo dos diversos fatores que podem interferir na reação intradérmica bem



Fig. 2 — Reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* (40 µg N/ml) feita no antebraço de pacientes com estrongiloidose.

como no estabelecimento do seu possível valor diagnóstico, a concentração do antígeno deva ser ajustada de modo a conter cerca de 40  $\mu\text{g}$  de N/ml.

Como foi feito na esquistossomose mansoni, torna-se necessário estabelecer o critério a ser adotado na interpretação da reação intradérmica na estrogiloidose utilizando-se antígeno de *S. ratti*. Para isso, o comportamento da reação em indivíduos seguramente livres de infecção pelo *S. stercoralis*, bem como em diferentes grupos de pacientes com estrogiloidose e portadores de outras helmintoses precisa ser conhecido.

#### SUMMARY

*Intradermal test with Strongyloides ratti antigen in human strongyloidiasis.*

Skin tests were performed on 30 patients with strongyloidiasis using a merthiolated Coca's extract prepared from filariform larvae of *S. ratti*. The antigen was used in 3 concentrations containing 40.4 and 0.4  $\mu\text{g}$  N per ml. There was a linear relationship between the log concentrations of the antigen and the mean area of the wheals. It was suggested to use the antigen diluted as to contain about 40  $\mu\text{g}$  N per ml in order to assess the diagnostic value of the test and to study the factors influencing the cutaneous response.

#### REFERÊNCIAS

1. BAERMANN, G. — Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. mit. h. Geneesk. Lab. te Weltvreden. Feestbundel, Batavia, 1917. p. 41-47.
2. BRANNON, M. J. C. & FAUST, E. C. — Preparation and testing of a specific antigen for diagnosis of human strongyloidiasis. Am. J. trop. Med. 29:229-239, 1949.
3. FULLEBORN, F. — Spezifische Kutanreaktionen bei Infektion mit *Strongyloides* und anderen Helminthen. Arch. f. Schiffs- u. Tropen-Hyg. 30:732-749, 1923.
4. FULLEBORN, F. — Über Cutanreaktion bei Strongyloidesinfektion. Klin. Wochenschr. 4:1709, 1925.
5. KOCH, F. C. & HANKE, M. E. — Practical methods in biochemistry. 5<sup>a</sup> ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1948.
6. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. 8:499-509, 1956.
7. PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. III. Influência da idade, sexo, cor e local da reação. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:218-223, 1960.
8. PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J. M. P. & MACEDO, D. G. — Quantitative aspects of the intradermic test with cercarial antigen in schistosomiasis. J. Parasitol. 43:304-307, 1957.

Recebido para publicação em 25 julho 1961.