



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Interação e associação dos fatores de risco entre *Toxocara* sp. e *Giardia duodenalis* e alergia em crianças atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Uberlândia-MG

Daliane Faria Grama

Uberlândia – MG

Julho - 2015



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Interação e associação dos fatores de risco entre *Toxocara* sp. e
Giardia duodenalis e alergia em crianças atendidas no Hospital de
Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG),
Uberlândia-MG**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção do título de Doutor.

Daliane Faria Grama

Aluna

Profª Drª Márcia Cristina Cury

Orientadora

Uberlândia – MG

Julho-2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G745i Gramma, Daliane Faria.
2015 Interação e associação dos fatores de risco entre *Toxocara* sp. e *Giardia duodenalis* e alergia em crianças atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Uberlândia-MG / Daliane Faria Gramma. – 2015.
 126 f. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Cury.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Giardia - Teses. 3. Crianças - Doenças - Teses. 4. Fatores de risco – Teses. I. Cury, Márcia Cristina. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



Daliane Faria Gramma

“Interação e associação dos fatores de risco entre Toxocara sp. e Giardia duodenalis e alergia em crianças atendidas no hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Uberlândia, MG”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de julho de 2015.

Susana Zevallos
Profa. Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano
IMT/USP

Maria Aparecida Gomes
Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes
UFMG

Jean Ezequiel Limongi
Prof. Dr. Jean Ezequiel Limongi
IG/UFU

Miguel Tannus Jorge
Prof. Dr. Miguel Tannus Jorge
FAMED/UFU

Márcia Cristina Cury
Profa. Dra. Márcia Cristina Cury – orientadora
ICBIM/UFU

Dedicatória

Aos meus pais

*Sueli Faria Gramma
Nelson Pissiguelli Gramma*

Pelo amor incondicional e paciência nas horas difíceis.
Por me darem a oportunidade da vida e do aprendizado.
Por me ensinarem a ter fé, esperança e amor.

À minha irmã

Daniela Faria Gramma

Pelo apoio em todos os sentidos da minha vida.
Pela compreensão dos meus defeitos e
por exaltar minhas qualidades.

À minha família

Faria & Gramma

Por me ajudarem a me desenvolver como ser humano,
pelo apoio, carinho, dedicação, paciência e respeito.

À memória de meu eternos amores...

Vovó Maria e Vovô Nilson

Vovó Maria, por estar comigo em todos os momentos da minha vida,
abençoando-me e orando para que os deveres possam ser cumpridos
aqui e após a vida. Sei e sinto todos os dias que a senhora está comigo.
Vovô Nilson por ter sido um exemplo para mim na área laboratorial, por me
estimular a questionar a ciência e principalmente, por ter me apresentado um
laboratório quando criança, o que provavelmente consciente ou
inconscientemente me fez apaixonar por aquele ambiente.

Pensamento

Confiança

Se você está no ponto de cair da confiança para a negação, tome alguns momentos para refletir, conversando consigo mesmo.

Se o desânimo lhe bate à porta, em razão de alguma dificuldade, recorde que a dificuldade é sempre uma lição por aproveitar, ao passo que o desânimo nunca auxiliou ninguém.

Se a irritação lhe cria aborrecimentos, o azedume é simplesmente uma nuvem entre você e a realidade.

Se você cometeu algum erro, isso significa tempo de aprender e não de desistir.

Se outros falharam, eis chegado o instante de mais confiança em Deus e em você mesmo.

Se injúrias apareceram, você encontrou a ocasião de agir e servir mais, conquistando a confiança dos outros.

Se temores lhe invadiram a mente, lembre-se de que sem comando seguro, não há máquina que funcione.

Se a enfermidade lhe visita as forças, estará você no grande momento de praticar a sua fé sem desacreditá-la.

Confiança é a sua coragem de superar-se, realizando o melhor ao seu alcance.

Se você está procurando a felicidade pela prática do bem, não perca o seu dia com dúvida ou desalento, porque confiando em Deus e em você mesmo, basta seguir em frente com o seu trabalho e você a encontrará.

XAVIER, Francisco Cândido. Busca e acharás. Pelo espírito de Emmanuel e André Luiz. 5º edição. São Paulo: André Luiz, 1978.

Agradecimentos

A *Deus* por me proporcionar toda a capacidade para que este trabalho fosse realizado contribuindo de alguma forma para a ciência e a humanidade. Por ter me ouvido e me atendido todas as vezes que fiz minhas orações, pedindo sabedoria, calma e a solução dos problemas. Agradeço ao meu mentor espiritual por me guiar e ser meu melhor amigo.

À minha família, que com certeza, é a base de toda a minha vida: minha mãe *Sueli Faria Gramma*, meu pai *Nelson Pissiguelli Gramma* e minha irmã *Daniela Faria Gramma*. Obrigada pelo amor, pela vida, pelos ensinamentos, pela convivência e paciência. Amo vocês mais que tudo!

Ao meu amor, *Danilo Leonel Silva Ferreira*, que por várias vezes me levou de madrugada para o laboratório, sem reclamar!!! Que me auxiliou a coletar parasitos, mesmo sem saber o que era e para que. Esta parte não é científica, mas contribui muito para a psicologia de um trabalho bem sucedido!

Às amigas que me ajudaram muito na execução do trabalho: *Kelem Cristina Pereira Mota*: como foi bom e valioso poder te conhecê-la e o melhor: ser sua amiga!! Obrigada por tudo que me auxiliou e incentivou na execução deste trabalho e pelo aprendizado compartilhado. *Juliana Silva Miranda*: Nossa! Como aprendi com você!! Obrigada pela paciência, competência, profissionalismo e exemplo. Espero que nossa amizade seja infinita. *Brunna Dos Anjos Pultz*: obrigada por todo auxílio na execução do projeto, seriedade, iniciativa e amizade.

Agradeço ao técnico *João da Costa Viana* da Universidade Federal de Minas Gerais por todo carinho, dedicação e colaboração com meus estudos e desenvolvimento do projeto desde a monografia até o doutorado, juntamente à Professora Doutora *Maria Aparecida Gomes* pela colaboração no projeto.

Às técnicas do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, por todo carinho, auxílio e amizade e, em especial para *Elaine Silva Marques Faria*.

Aos professores do laboratório, em especial, Professor Doutor *Sydnei Magno da Silva*, pelo incentivo, auxílio e os diálogos sempre produtivos.

Ao Professor Doutor ***Jean Ezequiel Limongi*** por todo ensinamento, paciência, auxílio, amizade e colaboração nos trabalhos.

Ao Doutor ***Gesmar Rodrigues Silva Segundo*** e a Dra. ***Karla Pereira Fernandes***: sem eles o trabalho não poderia ter se concretizado. Obrigada pela colaboração primordial, pelos ensinamentos, confiança e credibilidade na execução do projeto no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Professor Doutor ***Ernesto Akio Taketomi*** pela colaboração no projeto, pelos ensinamentos e por ter cedido o Laboratório de Imunologia para execução dos experimentos.

À Doutora ***Deise Aparecida de Oliveira Silva*** por toda atenção, colaboração, empenho e dedicação. Obrigada por toda paciência e ensinamentos!

À Mestra ***Rubia Mara Rodrigues Amorim*** pelo apoio e atenção no início do desenvolvimento do projeto.

À Dra. ***Susana Zevallos Lescano***, a Dra. ***Fabiana Martins de Paula*** e ao Professor Doutor ***Pedro Paulo Chieffi*** que me recepcionaram da melhor forma possível no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, com hospitalidade, cordialidade e paciência para ensinar. Obrigada em especial à Dra. Susana pelo auxílio na execução do projeto, pelos diálogos amigos e pela convivência em São Paulo que foi rápida, porém muito proveitosa! Obrigada, Dra. Fabiana, pelo empenho na liberação do projeto, auxílio na execução e convivência tanto em Uberlândia, quanto São Paulo.

Ao Professor Doutor ***Ricardo Wagner de Almeida Vitor*** da Univerdidade Federal de Minas Gerais por toda atenção e empenho em auxiliar nos experimentos.

A todas as equipes do Ambulatório de Pediatria e do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

A todos os pais que consentiram a participação de seus filhos no projeto, tornando meu trabalho possível.

Às amigas ***Meire de Cássia Alves, Caroline Rodrigues de Souza e Letícia Rodrigues de Souza*** que mesmo estando longe fisicamente de mim, estiveram sempre presentes de alma e coração, interessando pelo meu trabalho, dando ideias e apoiando.

Às amigas ***Camila Oliveira Silva, Marcela Rodrigues de Sousa Porta, Karen Ferraz Faria, Letícia Pereira Hungari, Maria Júlia Rodrigues da Cunha, Natália de Melo Nasser Fava, Luana Araújo Macedo Scalia*** e ao amigo ***Paulo Vitor Alves Ribeiro*** pela amizade e apoio em todos os momentos que precisei. Nossos momentos dentro do laboratório e fora dele foram maravilhosos e espero que continuem sendo. Gosto muito de todos vocês!

À amiga ***Marcela Fernandes Barcelos*** pelos momentos de descontração, apoio, dedicação e pela sintonia que temos! Você me ajudou muito!

Aos amigos do ***Caic Laranjeiras*** obrigada pelo apoio!

Aos meus amigos e parentes: obrigada pelo incentivo e carinho.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação ***Luceleide Freitas Queiroz Damásio e Lucélia da Costa Assis*** pelo apoio, atenção e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do projeto.

E a todos aqueles que participaram de forma direta ou indiretamente deste trabalho.
Muito obrigada.

Agradecimento especial

Cara professora e orientadora!

Sempre que nos encontramos na situação de aluno/orientando, nos sentimos um pouco desorientados, precisando que alguém nos dê o norte a seguir, que nos diga palavras que gerem os famosos “desequilíbrios”, palavras que nos incentivem a seguir em busca de algo novo e maior e que nos mostre novos horizontes, ou eu diria que não necessariamente mostre esses horizontes, mas que nos diga que eles existem e, assim, partimos em busca deles, inicialmente tateando no escuro, mesmo não tendo muita certeza que eles existam, porém acreditando no que foi dito, portanto, eles devem existir até que, num belo dia....uma luz, como uma estrela a nos guiar, nos indica o caminho para este novo, lindo, instigante e surpreendente horizonte...

Obrigada por motivar a ter essa curiosidade, esse amor pela ciência e principalmente por me guiar na busca desse destino.

Hoje, exatamente hoje, eu completo 11 anos dentro da Universidade Federal de Uberlândia, destes, durante 8 anos e meio estivemos juntas!!São muitas histórias, muitos momentos, alguns de dificuldade, outros de alegria e boas risadas!

Foram várias pessoas que vi entrar e sair do laboratório! No início, eu era a aprendiz (e continuo sendo) e agora sou eu quem me despeço! Mas não me despeço de você completamente, apenas desta etapa, para poder me preparar para outras que virão e que eu espero que sejam ao seu lado!

Muito obrigada pela sua orientação científica e pessoal. Obrigada pelo apoio, carinho, paciência, dedicação, respeito e amizade. Se um dia eu adquirir um pouco do seu conhecimento e experiência, já me sentirei satisfeita na profissão!

Que Deus abençoe você e a ilumine sempre.

Meu grande e eterno carinho à minha orientadora Professora Doutora ***Márcia Cristina Cury***,

Com carinho, a überlandense
Daliane Faria Gramma

Lista de Figuras

Figura 1: Amostra de fezes de criança atópica com cistos de *Giardia duodenalis*.

pág. 65

Figura 2: Amostra de fezes de criança não atópica com cistos de *Giardia duodenalis*.

pág.71

Figura 3: Comparação dos níveis de IgE específica ao extrato alergênico de *D. pteronyssinus* (Dpt) entre indivíduos sorologicamente positivos e negativos para *Toxocara* sp. e entre os grupos atópicos, não atópicos e amostra geral.

pág. 77

Figura 4: Comparação dos níveis de IgE específica ao extrato alergênico de *D. pteronyssinus* (Dpt) entre indivíduos positivos e negativos para *Giardia duodenalis* e entre os grupos atópicos, não atópicos e amostra geral.

pág.78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Perfil demográfico referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág. 46

Tabela 2: Perfil socioepidemiológico referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.47

Tabela 3: Perfil clínico referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.48

Tabela 4: Perfil dos exames laboratoriais referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.49

Tabela 5: Positividade dos diferentes alérgenos utilizados para caracterizar a atopia na realização do teste cutâneo de puntura (n=122 crianças).

pág.50

Tabela 6: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.52

Tabela 7: Perfil clínico e laboratorial de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia

Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.55

Tabela 8: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.59

Tabela 9: Perfil clínico e laboratorial de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.62

Tabela 10: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.66

Tabela 11: Perfil clínico e laboratorial de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.69

Tabela 12: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.72

Tabela 13: Perfil clínico e laboratorial de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período Novembro de 2011 a Março de 2013.

pág.75

Tabela 14: Amostras positivas para *Giardia duodenalis* de acordo com exame parasitológico (Faust, 1939) realizado nas fezes de crianças que participaram do estudo no período de novembro de 2011 a março de 2013.

pág. 79

Lista de Abreviaturas

1. **%** - Por cento/ Porcentagem
2. **A. suum** – *Ascaris suum*
3. **ABTS** - 2,2'-azino-bis-(3-etylbenzotiazolina-6-sulfonato)
4. **APA** – Associação Protetora dos Animais
5. **Bla g** - *Blattella germanica*
6. **Blo t** - *Blomia tropicalis*
7. **Can f** - *Canis familiaris*
8. **CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa
9. **D.O** – Densidade óptica
10. **Der f** - *Dermatophagoides fariniae*
11. **Der p** - *Dermatophagoides pteronyssinus*
12. **Dpt** - *Dermatophagoides pteronyssinus*
13. **EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
14. **ELISA** – Enzyme linked immunosorbent assay
15. **Fel d** - *Felis domesticus*
16. **g** - Gravidade
17. **G. duodenalis** – *Giardia duodenalis*
18. **H₂O₂** – Água oxigenada
19. **H₂SO₄ 2N** – Ácido sulfúrico 2 normal
20. **HC** – UFU - Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
21. **HCL** – Ácido clorídrico
22. **IA** – Índice de avidez
23. **IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
24. **IC** – Índice de Confiança
25. **IgA** – Imunoglobulina A
26. **IgE** – Imunoglobulina E
27. **IgG** – Imunoglobulina G
28. **IgM** – Imunoglobulina M
29. **IL** – Interleucina
30. **IMT** – Instituto de Medicina Tropical
31. **Kg** – Kilograma
32. **L₂** – Larva de segundo estádio
33. **LMO** – larva *migrans* ocular

34. **LMV** – larva *migrans* visceral
35. **M** - Molar
36. **mg** – Miligramas
37. **min** – Minutos
38. **mL** - Mililitro
39. **mM** – Milimolar
40. **mm³** - Milímetros cúbicos
41. **n** – Número
42. **N₂** – Gás nitrogênio
43. **NAOH** – Hidróxido de sódio
44. **nm** - Nanômetros
45. **°C** – Graus Celsius
46. **OPD** - Orto-fenilenodiamina
47. **OR** – Odds Ratio
48. **PBS** - Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
49. **PBS -T** - Phosphate buffered saline - Teew (Tampão fosfato salino - Teew)
50. **PCR** – Polymerase Chain Reaction
51. **pH** – Potencial Hidrogeniônico
52. **PMSF** - Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto de fenilmetilsulfonila)
53. **T. canis** – *Toxocara canis*
54. **TCD4+** - Línfócitos do cluster de diferenciação 4
55. **TCP** – Teste cutâneo de puntura
56. **TES** – Antígeno de excreção e secreção de *Toxocara* sp.
57. **TMB** - Tetrametilbenzidina
58. **UAI** – Unidade de Atendimento Integrado
59. **UBS** - Unidade Básica de Saúde
60. **UBSF** – Unidade Básica de Saúde da Família
61. **UFU** – Universidade Federal de Uberlândia
62. **USP** – Universidade de São Paulo
63. **x** - Vezes
64. **μg** - Microgramas
65. **μm** - Micrômetros

Sumário

Resumo	21
Abstract	23
1- Introdução	25
2 - Objetivos	31
2.1 - Geral	32
2.2 - Específicos	32
3 - Material e Métodos	33
3.1 - Área de estudo	34
3.2 - População de estudo	34
3.3 - Autorização e aprovação do Comitê de Ética	35
3.4 – Caracterização da atopia	35
3.5 – Instrumento de coleta de dados	35
3.6 – Coleta de amostra sanguínea	36
3.7 - Hematologia	36
3.8 – Coleta da amostra fecal	36
3.9 - Pesquisa de cistos ou trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	37
3.10 - Obtenção de extratos fecais	37
3.11 - Obtenção dos trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> para preparo de antígeno	38
3.12 - Preparo de Antígeno Solúvel de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	38
3.13- Preparo de Antígeno de Excreção/Secreção de <i>Toxocara canis</i> (TES)	39
3.14 - Produção de Extrato de <i>Ascaris suum</i> adulto (AWE)	39
3.15 - Detecção dos anticorpos IgG específicos a <i>Toxocara</i> sp.	40
3.16 - Avidez dos Anticorpos IgG pelo ELISA	40
3.17 - Detecção de anticorpos IgG específicos a <i>G. duodenalis</i>	41
3.18-Detecção de anticorpos IgA secretora específicos a <i>G. duodenalis</i>	41
3.19 -Detecção de anticorpos IgA sérica específicos a <i>G. duodenalis</i>	42
3.20 - Extrato Solúvel de <i>D. pteronyssinus</i>	42
3.21 - Detecção de anticorpos IgE específicos a <i>D. pteronyssinus</i>	42
3.22 - Análise Estatística	43
3.23 - Divulgação dos resultados e retorno para os pacientes	44
4 - Resultados	45
4.1 - Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica (HC-UFG)	46
4.2 - Perfil sociodemográfico das crianças atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia	46
4.3 - Soroprevalência de <i>Toxocara</i> sp. e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças atopicas:	51
4.4 - Soroprevalência de <i>Toxocara</i> sp. e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças atopicas:	53
4.5 – Determinação do Índice de Avidez dos anticorpos IgG anti <i>Toxocara</i> em crianças atopicas:	57
4.6 - Soroprevalência de <i>Toxocara</i> sp. e análise de variáveis sociodemográficas e	58

comportamentais associadas à infecção em crianças não-atópicas:	
4.7 - Soroprevalência de <i>Toxocara</i> sp. e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças não atópicas:	61
4.8 – Determinação do Índice de Avidez dos anticorpos IgG anti <i>Toxocara</i> em crianças não atópicas:	64
4.9 - Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças atópicas:	65
4.10 - Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças atópicas:	68
4.11 - Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças não atópicas:	71
4.12 - Prevalência de <i>Giardia duodenalis</i> e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças não atópicas:	74
4.13 – Análise dos níveis de IgE específica para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> entre indivíduos positivos e negativos para <i>Toxocara</i> sp. e <i>Giardia duodenalis</i> .	77
4.14 - Concordância entre os métodos sorológicos IgA sérica anti <i>Giardia</i> , IgA fecal anti <i>Giardia</i> e IgG anti <i>Giardia</i> e comparação dos exames coproparasitológicos para <i>G. duodenalis</i> com os exames sorológicos	79
5 - Discussão	80
6 - Conclusão	92
7 – Referências Bibliográficas	94
8 - Anexos	112
8.1 – Autorização do Comitê de Ética IMT-SP	113
8.2 – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Humana	114
8.3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	115
8.4 – Questionário Clínico e Sócioepidemiológico	118
8.5 – Artigo publicado em periódico (referente à tese)	121

Resumo

Estudos epidemiológicos realizados em todo o mundo sugerem que a infecção causada por *Toxocara* sp. e *Giardia duodenalis* podem contribuir para o desenvolvimento ou agravamento de doenças atópicas, principalmente em crianças. Este estudo determinou a soroprevalência de toxocaríase e a prevalência de *G. duodenalis* em crianças atópicas e não atópicas atendidas no ambulatório de pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, identificando as possíveis relações com fatores epidemiológicos. Amostras de sangue foram coletadas de 122 crianças atópicas e 51 crianças não atópicas entre 6 e 15 anos que fizeram previamente o prick teste para confirmar a atopia, além de exames clínicos. Fatores de risco ou proteção para toxocaríase e giardíase foram analisados por meio de questionário. Amostras de soro foram testadas para verificar a presença de anticorpos IgG anti*Toxocara*, IgG anti*Giardia*, IgA sérica anti*Giardia* e IgE específica para *Dermatophagoides pteronissynus* utilizando ELISA. O índice de avidez dos anticorpos IgG anti*Toxocara* foi determinado para verificar se a infecção era recente ou tardia. Amostras de fezes foram também coletadas para verificar a presença de cistos e/ou trofozoítos de *G. duodenalis*. Extratos fecais foram produzidos para realização do ELISA para IgA fecal anti*Giardia*. A soroprevalência para *Toxocara* sp. em crianças atópicas foi de 19,7%. Nenhuma associação significante foi encontrada entre a infecção e possíveis fatores em crianças atópicas. Na maior parte das amostras o índice de avidez foi alto, indicando uma infecção adquirida há mais tempo. A prevalência de *G. duodenalis* em crianças atópicas foi de 5,7%. Ter parentes de primeiro grau com alergia foi a única variável que apresentou associação significante com a giardíase em crianças atópicas. Na comparação entre os níveis de IgE específica para *D. pteronyssinus* entre indivíduos sorologicamente positivos e negativos para *Toxocara* sp. e, positivos e negativos para *G. duodenalis* verificou-se que não houve diferença estatisticamente significante. O Kappa de concordância entre IgA sérica anti*Giardia*, IgA fecal anti*Giardia* e IgG anti*Giardia* foi baixo denotando uma reprodutibilidade ruim. Embora não tenha sido encontrada associação estatística entre toxocaríase humana e atopia, o presente estudo revelou alta soroprevalência de *Toxocara* sp em crianças, o que pode indicar uma contaminação ambiental com ovos do parasito no mesmo ambiente onde essas crianças vivem. Em relação à giardíase, a única variável relacionada estatisticamente foi o fato das crianças atópicas terem parentes de primeiro grau também com atopia. Conjectura-se que neste estudo, atopia e parasitismo podem não ter uma relação, entretanto, mais estudos são necessários.

Palavras-chave: atopia, crianças, ELISA, fatores de risco, *Giardia duodenalis*, *Toxocara* sp.

Abstract

Epidemiological studies conducted around the world suggest that infection by *Toxocara* sp. and *Giardia duodenalis* may contribute to the development or exacerbation of atopic diseases, especially in children. This study analyzed the seroprevalence of toxocariasis and the prevalence of *G. duodenalis* in atopic and non-atopic children treated at the pediatric clinic of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia, to identify possible correlations with epidemiological factors. Blood samples were collected from 122 atopic children and 51 non-atopic children between 6 and 15 years old who underwent previous skin-prick testing to confirm atopy, as well as clinical examinations. Risk or protective factors for toxocariasis and giardiasis were analyzed by means of a questionnaire. Serum samples were tested for the presence of antibodies of anti-*Toxocara* IgG, anti-*Giardia* IgG, serum anti-*Giardia* IgA, and *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE, using ELISA. The avidity index of anti-*Toxocara* IgG antibodies was determined to check whether the infection was recent or delayed. Stool samples were also collected to check for the presence of cysts and/or trophozoites of *G. duodenalis*. Fecal extracts were produced to perform the ELISA for fecal anti-*Giardia* IgA. The seroprevalence of *Toxocara* sp. in atopic children was 19.7%. No significant association was found between the infection and possible factors in atopic children. Most of the samples showed a high avidity index, indicating long-standing infection. The prevalence of *G. duodenalis* in atopic children was 5.7%. The only variable that was significantly associated with giardiasis in atopic children was having first-degree relatives with allergy. A comparison of the levels of *D. pteronyssinus*-specific IgE among individuals serologically positive and negative for *Toxocara* sp. and positive and negative for *G. duodenalis* showed no statistically significant difference. The Kappa correlation between serum anti-*Giardia* IgA, fecal anti-*Giardia* IgA and anti-*Giardia* IgG was low, denoting poor reproducibility. Although no statistical association was found between human toxocariasis and atopic disease, this study revealed a high seroprevalence of *Toxocara* sp. in children, which may indicate environmental contamination with the parasite's eggs in the environment where these children live. As for giardiasis, the only statistically related variable was the fact that atopic children have first-degree relatives also with atopy. It is speculated that in this study, atopy and parasitism may not have a relation; however, further studies are needed.

Keywords: Atopy, children, ELISA, risk factors, *Giardia duodenalis*, *Toxocara* sp.

1- Introdução

A prevalência de asma e outras manifestações alérgicas têm aumentado consideravelmente em países desenvolvidos e tornou-se importante problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento. A asma e as manifestações alérgicas cutâneas são consideradas doenças crônicas comuns, estando, em muitos casos, associadas a infecções parasitárias helmínticas e por protozoários. Dentre essas parasitoses, a literatura menciona que *Entamoeba histolytica*, *Strongyloides* sp. e *Toxocara* sp. estão diretamente relacionados como causa de urticárias crônicas, além de rinites, bronquites recorrentes e asma. Entretanto, *Giardia duodenalis* tem sido excepcionalmente mencionada como causadora dessas alterações (AZIZ et al., 2001).

Estudos epidemiológicos demonstram vários fatores de risco para as diversas manifestações alérgicas (FIGUEIREDO et al., 2005; KUSTIMUR et al., 2007) e sugerem que a infecção causada pelo ascarídeo *Toxocara* sp. contribui para o desenvolvimento dessas manifestações, incluindo a asma (CHAN et al., 2001; LYNCH et al., 1993; PINELLI et al., 2006). Buijs et al. (1994) avaliaram a relação entre a soroprevalência e asma alérgica em crianças de 4-6 anos e encontraram associação entre asma recorrente e soropositividade para *Toxocara*. Esses autores acreditam que este parasito possa contribuir para a manifestação de asma em crianças predisponentes à alergia. Evidências de estudos epidemiológicos em vários países demonstram que manifestações alérgicas ocorrem frequentemente em indivíduos soropositivos para *Toxocara*, sugerindo que a infecção com este helminto contribui para desenvolvimento dessas alterações (PINELLI et al., 2007).

Toxocaríase é zoonose causada pelo *Toxocara canis* e/ou *T. cati*, nematódeos parasitos de cães e gatos, respectivamente. Em crianças, a infecção ocorre pela ingestão de ovos de *Toxocara* sp, pela contaminação direta das mãos, especialmente os dedos; contato direto com filhotes caninos e ou felinos, principalmente aqueles com idade entre duas semanas e seis meses e, de forma indireta, por meio de contato com objetos contaminados com ovos infectantes desse parasito, dentro e fora de casa e pela ingestão de solo contendo ovos e larvas (CARVALHO; ROCHA, 2011). Quando ovos contendo a larva infectante são ingeridos pelos humanos, hospedeiros não compatíveis, essa se torna livre e atravessa a parede intestinal, caindo na circulação sanguínea e chegando a vários órgãos, embora não se desenvolva na forma adulta. Três formas clínicas de toxocaríase são descritas: Larva *migrans* visceral (LMV), Larva *migrans* ocular (LMO) e toxocaríase oculta ou subclínica. A LMV pode invadir órgãos como fígado, pulmões, olhos e cérebro (KUSTIMUR et al., 2007) e os sintomas incluem eosinofilia, hepatomegalia, miocardite, nefrite, epilepsia, febre, urticária, desordens no sistema nervoso central, tosse, asma, dificuldades respiratórias graves e dor

abdominal (MAGNAVAL et al., 2001). A LMO ocorre unilateralmente entre crianças e adultos, podendo causar coriorretinite, uveíte, estrabismo e perda da visão. A infecção ocular pode ser subclínica e somente detectada durante exame ocular de rotina (FIGUEIREDO et al., 2005). Na toxocariase oculta, os sinais clínicos mais frequentes são febre, anorexia, dores de cabeça, dores abdominais, náusea, vômitos, pneumonia, tosse, asma e hepatomegalia, sendo que muitas vezes, os indivíduos não são diagnosticados devido às alterações não serem específicas (MAGNAVAL et al., 2001).

A larva de *Toxocara* sp. secreta e excreta produtos altamente imunogênicos, os quais promovem a resposta imune celular do tipo Th₂, levando à produção de IL-4 e IL-5, responsáveis pela indução de IgE e eosinofilia. Além disso, a liberação de antígenos durante a migração em tecidos como fígado e pulmões, provocam reações imunoinflamatórias resultando numa variedade de doenças, incluindo as do trato respiratório. Infecções com *Toxocara* sp. podem acelerar a expressão de afecções como a asma em crianças suscetíveis e ou agravar asma preexistente. (BUIJS et al., 1997; DEL PRETE et al., 1991;).

A toxocariase humana é uma das mais comuns infecções zoonóticas do mundo e a soroprevalência varia entre 2 a 92,8%, de acordo com a região geográfica e a idade do grupo estudado (BUIJS et al., 1994; PARK et al., 2002). A soroprevalência de *Toxocara* sp. tem sido amplamente investigada na etiologia da asma especialmente em crianças, uma vez que estas podem ser expostas mais comumente à infecção por esse helminto em parques infantis, praças públicas e tanques de areia, além de outros fatores de risco associados (BUIJS et al., 1997; CHAN et al., 2001; SHARGHI et al., 2001).

A respeito da alta prevalência, mesmo em países industrializados, é infecção relativamente negligenciada, sendo uma das razões a dificuldade no diagnóstico direto (COOPER, 2008). Desta forma, o ELISA (Ensaio ImunoEnzimático) é o método utilizado para diagnóstico de toxocariase humana e para estudos epidemiológicos na detecção de IgG, imunoglobulina reativa aos抗ígenos de excreção e secreção de *Toxocara* (TES). A sensibilidade e a especificidade desse método variam de acordo com o antígeno utilizado (GARCIA, 2001; TAYLOR; HOLLAND, 2001). Além disso, o índice de avidez (afinidade funcional) de anticorpos IgG específicos parece ser útil para discriminar entre fase aguda e crônica da infecção, ou seja, os anticorpos IgG com alta avidez estão associados com a fase crônica e IgG, com baixa avidez, associados à toxocariase adquirida recentemente (HUBNER, et al., 2001).

O protozoário flagelado *Giardia duodenalis*, responsável pela giardíase, está associado com manifestações alérgicas em 70% dos portadores sintomáticos (DI PRISCO et al., 1998).

Um aumento na incidência de urticária e alergia a alimentos em giardíase pode ser sugestivo de alterações em células da mucosa intestinal que levam à absorção de substâncias estranhas e desenvolvimento de alergia (DI PRISCO et al., 1998; HARDIN et al., 1997).

De acordo com Nenoff et al. (2005), as manifestações cutâneas associadas à giardíase ocorrem raramente, mas quando observadas, a urticária e o angioedema são os mais comuns. Em estudo realizado por Bayraktar et al. (2005), confirmou-se associação entre giardíase e condições alérgicas, no qual 36,9% dos casos tinham algum sintoma alérgico, como urticária ou coceira. Os autores mencionam que o desaparecimento destes sintomas ocorreu após terapia com metronidazol. Por outro lado, em estudo realizado no Brasil por Souza et al. (2012), a presença de sintomas de asma, atopía e níveis de IgE não foram associados com a presença de infecção por *G. duodenalis* em crianças.

A giardíase é, usualmente, autolimitante em indivíduos imunocompetentes, indicando a presença de mecanismos efetivos de defesa do hospedeiro contra o parasito (ECKMANN, 2003). Estudos têm demonstrado que a resposta imune do hospedeiro no controle da infecção primária por *G. duodenalis* é resultante da grande variedade de fatores imunológicos, incluindo células TCD4⁺ e citocinas, óxido nítrico, mastócitos intestinais e seus produtos e a ação de células B e seus anticorpos (ABDUL-WAHID; FAUBERT, 2008). Células mastocitárias são importantes na imunidade pelo aumento da produção de IL-6 bem como na alergia, via desgranulação e liberação de vários mediadores como, histamina, citocina e leucotrienos (LI et al., 2004).

Vários estudos utilizando secreções intestinais de camundongos infectados demonstram a presença de anticorpos IgA, IgG e IgM específicos à *G. duodenalis* (ABDUL-WAHID; FAUBERT, 2008; HEYWORTH, 1986; HEYWORTH, 1992; SKEA; UNDERDOWN, 1991; SNIDER; UNDERDOWN, 1986). Esses anticorpos atuam diretamente no controle da giardíase, pois se ligam aos抗ígenos de superfície presentes no disco adesivo dos trofozoítos, interferindo na aderência à mucosa intestinal, além de promoverem a imobilização e aglutinação do parasito (HEYWORTH, 1986; LANGFORD et al., 2002). Anticorpos IgA são os isótipos mais abundantes na mucosa intestinal, e provavelmente a produção destes é o fator mais importante para o controle e eliminação do parasito no intestino delgado (LANGFORD et al., 2002; SKEA; UNDERDOWN, 1988; SKEA; UNDERDOWN, 1991; SNIDER; UNDERDOWN, 1986; SNIDER; SOLAYMANI-MOHAMMADI; SINGER, 2010). Além dessas imunoglobulinas Perez et al. (1994) e Di Prisco et al. (1998), observaram níveis de IgE totais em indivíduos com giardíase. A IgE parece contribuir para eliminação do parasito por meio de citotoxicidade direta, lise mediada

por complemento ou opsonização (HEYWORTH, 1992). Essa imunoglobulina é citada na literatura como importante na imunidade a infecções helmínticas, entretanto抗原os de *G. duodenalis* podem conter moléculas “allergen-like” que aumentariam a produção de IgE total e específica (JIMENEZ et al., 2004). A ligação cruzada de IgE nos mastócitos e eosinófilos pelos receptores iniciaria a ativação e subsequente liberação destes mediadores, tais como histamina, que atuariam em diferentes tecidos, causando doenças alérgicas em um indivíduo com giardíase. Altos níveis de IgE totais têm sido observados em indivíduos com giardíase, particularmente nos casos de alergia (BAYRAKTAR et al., 2005; GIACOMETTI et al., 2003).

G. duodenalis é protozoário flagelado que se reproduz no intestino delgado causando a giardíase (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010), sendo considerado um dos principais parasitos responsáveis pela disfunção gastrointestinal em humanos e outros animais. É problema global de saúde pública, com 300 milhões de pessoas infectadas a cada ano (MORRISON et al., 2007). A prevalência varia de acordo com a área geográfica estudada e a metodologia empregada no diagnóstico. Estudos realizados demonstram que entre a população, as crianças, principalmente as de idade pré-escolar, idosos e imunocomprometidos são os mais acometidos. De acordo com Plutzer, Ongerth, Karanis, (2010) a giardíase foi incluída pela Organização Mundial de Saúde como “doença negligenciada”, na qual ainda existem lacunas na compreensão de sua importância.

A transmissão ocorre por contaminação oro-fecal, principalmente pela água, alimentos ou fômites contaminados com cistos do parasito, sendo importante ressaltar a transmissão pelo contato pessoa-pessoa (TEIXEIRA; HELLER; BARRETO, 2007). Muitos surtos estão associados à contaminação de cursos de água e a processos deficientes de tratamento e distribuição da mesma (FAYER, 2004; ROSE; HAAS; REGLI, 1991). Há uma série de indicações que animais e humanos servem como contaminantes de abastecimento de água, mas a frequência da transmissão zoonótica, antroponótica, antropozoonótica ou zooantroponótica e a questão de quem infecta quem, permanecem obscuras (PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010).

A patogenia dessa parasitose não está claramente entendida, entretanto segundo Solaymani-Mohammad, Singer (2010), incluem ruptura da barreira epitelial, defeitos na borda do epitélio, secreção de íons cloreto e hiperatividade da musculatura lisa intestinal. O espectro de manifestações clínicas da giardíase humana é amplo, variando de leve e transitório a sintomas característicos, constituídos por um início agudo de diarreia, cólicas

abdominais, acompanhada de náuseas e perda de peso (FARTHING, 1996; LEBWOHL; DECKELBAUM; GRENN, 2003; PLUTZER; ONGERTH; KARANIS, 2010)

Em se tratando da relevância da *G. duodenalis* como problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, o diagnóstico é impreciso e insatisfatório (STIBBS; SAMADPOUR; MANNING, 1988). Atualmente, este é realizado na rotina, pela demonstração de cistos ou trofozoítos nas fezes de pacientes. O exame parasitológico de fezes muitas vezes se mostra ineficaz, quando o parasito é diagnosticado por um único exame de fezes, devido ao padrão intermitente na eliminação de cistos, sendo necessárias, no mínimo, três amostras fecais coletadas em dias alternados (ADAM, 2001; GOKA et al., 1990; HEYMANS; ARONSON; VAN HOOFT, 1987; UNGAR et al., 1984; WOLFFE, 1992). O ELISA e a PCR são considerados poderosos instrumentos para a detecção da infecção, apresentando sensibilidade de 92% e especificidade de 98% (UNGAR et al., 1984).

Os estudos procuram elucidar a existência ou não da associação entre alergia e parasitismo, assim como também se o indivíduo alérgico é mais suscetível ou não à infecção parasitária ou o inverso e qual mecanismo utilizado para que os processos ocorram.

Em relação à toxocaríase, existem trabalhos realizados a partir de observações em humanos e modelos experimentais, que associam manifestações alérgicas à doença. Entretanto, *G. duodenalis* tem sido excepcionalmente mencionada como causadora de manifestações alérgicas, havendo poucos estudos no Brasil, sobre a associação entre alergia e esse parasitismo.

Baseado nisto, há necessidade de estudos que tentem elucidar a existência ou não de associação não somente de alergias com helmintos, mas também com protozoários, observando não somente a prevalência, mas também variáveis clínicas e imunológicas.

2-Objetivos

Geral:

Determinar se existe relação entre a soroprevalência de anticorpos IgG anti*Toxocara* e a presença de *G. duodenalis* com manifestações alérgicas observadas em crianças atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Específicos:

- Determinar a soroprevalência para *Toxocara* sp. e prevalência para *G. duodenalis* em todas crianças que apresentarem qualquer manifestação alérgica;
- Determinar a ocorrência de cistos e /ou trofozoítos de *G. duodenalis* pelo exame coprológico em crianças atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia;
- Comparar os resultados obtidos pela sorologia com os exames coproparasitológicos para *G. duodenalis*;
- Determinar o Índice de Avidez dos anticorpos IgG anti*Toxocara*, para verificar se a infecção é recente ou tardia;
- Estabelecer associação entre a soroprevalência para *Toxocara* sp. e variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas;
- Estabelecer associação entre a positividade para *G. duodenalis* e variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas;
- Verificar se os níveis de IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) estão maiores nos indivíduos positivos para *G. duodenalis* e sorologicamente positivos para *Toxocara* sp.
- Verificar a concordância entre IgG anti*Giardia*, IgA fecal anti*Giardia* e IgA sérica anti*Giardia*.

3-Material e Métodos

3.1 - Área de estudo:

O município de Uberlândia está situado na região oeste do estado de Minas Gerais, denominada Triângulo Mineiro. Localiza-se geograficamente na latitude de 18° 55' 25" Sul e longitude de 48° 16' 38" Oeste. O município possui 4.115,822 Km² e temperatura média anual de 22,6°C. A população de Uberlândia no ano de 2010 foi estimada em 600.285 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

A população überlandense e de outros municípios em regiões próximas é assistida, na área da saúde, pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pelas Unidades de Atendimento Integrado (UAIs) que são unidades mistas, com atendimento ambulatorial na atenção básica e pronto atendimento funcionando 24 horas todos os dias, pelas Unidades Básicas de Saúde (UBS) e pelas Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF).

3.2 - População de estudo:

O estudo foi conduzido com número amostral mínimo de 122 crianças entre 6-15 anos, portadoras de manifestações alérgicas e atópicas, atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Durante a triagem da amostra, todas as crianças que fizeram o teste cutâneo de puntura (TCP) e foram consideradas positivas (n=122) foram incluídas no grupo de pacientes atópicos, entretanto 51 crianças tiveram o teste considerado negativo, sendo não atópicas. Inicialmente este grupo seria excluído do trabalho, mas observou-se que essa amostra poderia contribuir com dados importantes de comparação para o estudo. Assim, optou-se por dois grupos: 122 crianças atópicas e 51 crianças não atópicas.

Foram excluídas do estudo as crianças que apresentaram pelo menos uma das seguintes características:

- crianças com idade inferior a seis anos e superior a 15 anos;
- presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- tratamento com drogas antiinflamatórias esteroidais e/ou anti-histamínicos de primeira ou segunda geração, no período inferior a duas semanas que antecederam o atendimento (KANCELJAK-MACAN et al., 2002);
- não assinatura do Termo de Consentimento pelos pais ou responsáveis (Anexo III);
- recusa em participar do estudo por qualquer motivo.

3.3 - Autorização e aprovação do Comitê de ética:

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia sob registro 083/10 (Anexo I) e pela Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP) sob o número CPE-IMT 2010/086 (Anexo II).

3.4 - Caracterização da Atopia

Para caracterizar a atopia, foi realizado o teste cutâneo de puntura (TCP) ou *Prick test* descrito por Ownby (1988). Esse procedimento foi feito em todas as crianças que apresentaram caracteres de alergia após a consulta com o médico pediatra. Após antisepsia com álcool 70%, microgotas (aproximadamente 30 µL) de cada extrato alergênico foram depositadas na face interna do antebraço e as punturas realizadas com auxílio de lancetas apropriadas (ALK-Abelló, Horsholm, Dinamarca), mantendo-se distância de 3 cm entre os extratos. A leitura do teste foi realizada após 15 minutos. O teste cutâneo foi mensurado para os seguintes alérgenos: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), *Dermatophagoides farinae* (Der f), *Blomia tropicalis* (Blo t), *Canis familiaris* (Can f), *Felis domesticus* (Fel d), *Blattella germanica* (Bla g), fungos mix e gramínea mix, um controle positivo com histamina; um controle negativo com salina (FDA Allergenic, Immunotech, Brasil). As crianças participantes do estudo foram caracterizadas como atópicas se apresentassem reação cutânea positiva com pápula $\geq 3\text{mm}$ em relação àquelas do controle negativo. Crianças não atópicas não tiveram reação cutânea positiva para nenhum alérgeno.

3.5 - Instrumento de coleta de dados

Para coleta de dados, com intuito de delinear o perfil epidemiológico, questionário foi aplicado a todos os pais ou responsáveis pelo paciente. Este incluia idade, gênero, local de nascimento, tipo de residência, hábitos comportamentais, contato com animais e manifestações clínicas compatíveis com giardíase e/ou toxocaríase (Anexo IV). Para preservar a identidade das crianças, números seriais foram dados aos questionários, amostras sanguíneas e fecais.

3.6 - Coleta da amostra sanguínea

Amostras de sangue (5 mL) foram coletadas de cada criança por punção radial na região do antebraço, utilizando tubos Vacutainer descartáveis com e sem EDTA. As amostras sem EDTA foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos. As amostras com EDTA foram destinadas à realização do hemograma. Todas as amostras de sangue foram coletadas por profissionais da equipe de coleta do HC-UFG.

3.7 - Hematologia

O hemograma da amostra sanguínea da criança foi realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os resultados ficaram armazenados no sistema de dados do HC e somente os médicos e a responsável pela pesquisa tinham acesso a eles. Por meio do hemograma, obtivemos os dados relativos aos eosinófilos.

3.8 - Coleta da amostra fecal

Amostras fecais de todas as crianças foram coletadas e examinadas para a verificação da presença de cistos ou trofozoítos do protozoário *G. duodenalis*.

Frascos coletores identificados (número da criança e número de coleta), foram entregues aos pais ou responsáveis para coleta de três amostras fecais de cada criança de forma alternada, ou seja, as amostras eram coletadas com intervalos de 24 horas no período de uma semana. Este procedimento de três coletas deve-se ao padrão intermitente de eliminação dos cistos de *G. duodenalis*, visando aumentar a confiabilidade dos resultados (CARVALHO; CARVALHO; MASCARINI, 2006). Os frascos coletores identificados foram recolhidos, armazenados em caixa térmica, contendo gelo e transportados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia – UFU para seu processamento. Cada amostra colhida foi dividida em partes que serviram para pesquisa de cistos ou trofozoítos de *Giardia duodenalis* e para obtenção de extratos fecais.

3.9 - Pesquisa de cistos ou trofozoítos de *G. duodenalis*

Para pesquisa de cistos ou trofozoítos de *Giardia* foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco a 33%, segundo Faust et al. (1939). As fezes foram homogeneizadas com 10 mL de água destilada, posteriormente filtradas e centrifugadas por 1 min a 1500 x g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspensão em água destilada, completando o volume de 10 mL e novamente centrifugado. Foram realizadas centrifugações, até a obtenção de sobrenadante claro que foi descartado e o sedimento ressuspensão em solução de sulfato de zinco até completar o volume de 10 mL, sendo realizada nova centrifugação a 1500 x g por 2 minutos. Após este período, completou-se o tubo até a superfície com a mesma solução, colocando-se, lamínula sobre a borda do tubo e deixando-o em repouso por 10 minutos. A lamínula foi depositada sobre lâmina com uma gota de lugol e, em seguida, observada nas objetivas de 10x e 40x do microscópio óptico Olympus CH-2 (Olympus, Japão). Três lâminas de cada amostra foram analisadas por dois pesquisadores para averiguar a presença de cistos ou trofozoítos de *G. duodenalis*.

3.10 - Obtenção de extratos fecais

Os extratos fecais foram preparados de acordo com Amorim et al. (2010) com modificações. Foram adicionadas a um grama de fezes, 500 µL de PBS e 1 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonila - PMSF (Sigma Chemical Co.). Após homogenização e incubação por 1h a 4°C, os tubos foram homogeneizados no vórtex (Vortex Mixer KMC, Bionex, Korea) e centrifugados a 10.000 x g a 4°C por 10 min para remoção do material insolúvel. O sobrenadante (extrato fecal) foi coletado e estocado a -20° C até o momento do uso. Como cada criança coletou três amostras, foram obtidos três extratos fecais referentes à primeira, segunda e terceira coletas. Essas três amostras de cada criança foram descongeladas separadamente, homogeneizadas no vórtex e centrifugadas a 5000 x g a 4°C por 10 min. Posteriormente, os sobrenadantes foram juntados em única alíquota. Sendo assim, cada paciente obteve um único extrato fecal ao qual correspondeu as três amostras fecais obtidas.

3.11 - Obtenção dos trofozoítos de *G. duodenalis* para preparo de antígeno

Os trofozoítos do isolado humano Portland-1 (ATCC: 30888) de *G. duodenalis*, Assemblage A, foram cedidos pela Professora Doutora Maria Aparecida Gomes do

Laboratório de Amebíase do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde são mantidos em meio TYI-S-33 (DIAMOND; HARLOW; CUNNICK, 1978) modificado por Keister (1983) e suplementado com soro fetal bovino em posição inclinada em estufa bacteriológica com temperatura entre 35,5 e 37°C. Os repiques são realizados a cada 72/96 horas, sendo os trofozoítos obtidos em fase exponencial de crescimento, entre 48-72 horas de cultivo. Em seguida, tubos contendo os trofozoítos foram acondicionados em caixa térmica, mantendo-se temperatura constante de 37 °C, e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia. As formas trofozoíticas foram utilizadas para preparo do antígeno solúvel necessário para os ensaios imunológicos.

3.12 - Preparo de Antígeno Solúvel de trofozoítos de *G. duodenalis*

O antígeno solúvel de *G. duodenalis* foi preparado conforme metodologia descrita por Yanke et al. (1998) com modificações. Frascos contendo trofozoítos foram submetidos a banho de gelo por 30 minutos para deslocamento dos trofozoítos da parede do tubo e centrifugados a 500 x g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspenso em 10 mL de PBS estéril e gelado. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes e o último sedimento ressuspenso em 3 mL de PBS, acrescido dos inibidores de proteases: 30 µL de Fluoreto de Fenilmetilsulfonila – PMSF a 1,6 mM (Sigma ChemicalCo., MO, USA); 12 µL de Leupeptina a 100 µg/mL (Sigma Chemical Co.) e 20 µL de Aprotinina a 10 µg/mL (Sigma Chemical Co.). Em seguida, foram realizados 10 ciclos de congelamento em N₂ líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C. O extrato antigênico foi submetido a seis ciclos de 1 minuto em ultrassom, em banho de gelo, seguidos por centrifugação a 10000 x g, 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica determinada pelo método de Lowry (1951). Antes do acréscimo dos inibidores de protease, foi retirado uma amostra para simples contagem dos trofozoítos.

3.13 - Preparo de Antígeno de Excreção/Secreção de *Toxocara canis* (TES)

Parasitos adultos de *Toxocara* sp. foram obtidos pelas amostras fecais de cães filhotes tratados com sulfato de piperazina 46% (dose de 45mg/kg), provenientes de clínicas veterinárias particulares e Associação Protetora dos Animais (APA) do município de Uberlândia.

Os parasitos foram lavados com salina (0,85%) e somente as fêmeas foram selecionadas. O material foi colocado em caixa de isopor contendo gelo e transportado para o Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, para elaboração e obtenção do antígeno de Excreção e Secreção de *Toxocara* sp.

O antígeno foi preparado como descrito por Elefant et al. (2006), seguindo a versão modificada do método publicado por Savigny (1975). Resumidamente, ovos de *T. canis* foram coletados do útero de fêmeas e, para o embrionamento, os ovos foram incubados em formalina 2%, por um mês a 28 °C. Os ovos embrionados foram chocados artificialmente em meio Eagle livre de soro, e a suspensão, contendo as larvas de segundo estádio (L₂), foi transferida para o aparelho de Baermann, com o auxílio de um cotonete e, após 18 h, as larvas foram coletadas do fundo do aparelho. Culturas contendo as larvas foram incubadas a 37 °C e, em intervalos semanais, o fluido da cultura era removido e substituído por meio fresco. Foi adicionado inibidor de protease (5mL de 200mM Fluoreto de Fenilmetanosulfonila – PMSF (Sigma ChemicalCo., MO, USA) e concentrado 100 vezes em aparelho Amicon, dialisado com água destilada, centrifugado (18 500 g) a 4 °C por 60 min e filtrado por membrana Millipore 0,22 milímetros (Millipore, Danvers, MA). O conteúdo protéico foi determinado pelo Método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e os antígenos foram armazenados em alíquotas à -20 °C até o momento do uso.

3.14 - Produção de Extrato de *Ascaris suum* adulto (AWE)

Adultos, fêmeas e machos de *A. suum* foram obtidos do intestino de porcos abatidos em frigoríficos do município de Uberlândia-MG. Estes, após coleta e identificação, foram lavados e armazenados em solução fisiológica estéril a 4 C° até o momento do uso.

Anticorpos não-específicos presentes no soro foram removidos pela absorção com AWE. Este extrato antigênico foi obtido baseado em método descrito previamente (KANAMURA et al., 1981) com modificações.

O parasito *A. suum* foi macerado em água destilada e 1.5 M de NaOH foi adicionado até uma concentração final de 0.15 M. Após 2 h em temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada com 6 M HCl e centrifugada (18500 g) a 4 °C por 20 min. O conteúdo protéico do sobrenadante foi analisado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

3.15 - Detecção dos anticorpos IgG específicos a *Toxocara* sp.

Os anticorpos IgG anti*Toxocara* foram detectados pelo método ELISA com base no método descrito por Savigny et al. (1979), com algumas modificações (ELEFANT et al., 2006). A solução do antígeno TES (1,9 mg / mL em carbonato 0,1 M tampão bicarbonato, pH 9,6) foi utilizada para sensibilizar as placas de poliestireno (Corning Incorporated-Costar, Nova York E.U.A.). O bloqueio para o anticorpo IgG foi realizado com soro albumina bovino 1% (BSA, Sigma, E.U.A.) em 0,01 M de tampão fosfatosalina pH 7,2, contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T). Os soros foram pré-absorvidos com AWE (Extrato de *A. suum* adulto) (25 µg/ml) em PBS-T, por 30 min a 37 °C. Amostras de soro foram diluídas 1/320 para IgG. Conjugados de peroxidase foram diluídos 1/10000 para IgG anti-humano(Sigma, E.U.A.). Como substrato cromógeno, orto-fenilenodiamina (OPD) (0,4 mg/mL - OPD-Fast,Sigma, E.U.A.) e H₂O₂-uréia (0,4 mg / mL) em 0,05 M tampão citrato foram adicionados. A reação foi interrompida com 2 M H₂SO₄. A absorbância à 492 nm foi determinada em um leitor de microplacas (Titertek Multiskan MCC/340, Lab-system, Finlândia). Os valores de cut-off foram calculados com base na média da absorbância de soros de pacientes negativos.

3.16 - Avidez dos Anticorpos IgG pelo ELISA

A determinação do índice de avidez (IA) do anticorpo IgG foi baseado no método dissociativo utilizando uréia como agente denaturante (HEDMAN et al., 1989). Amostras de soro foram diluídas 2x em PBS e aplicadas em duplicata em placas de microtitulação. Após incubação por 40 min a 37 °C, um poço da duplicata foi lavado 3x com PBS-T por 5 min; do mesmo modo, o outro poço foi lavado com 8 M de uréia dissolvido em PBS-T. O índice de avidez foi calculado dividindo a absorbância da amostra tratada com uréia pela amostra não tratada e multiplicado por 100. Todos os valores maiores que 50% foram ordenados como IgG com alta avidez (HEDMAN; ROUSSEAU, 1989).

3.17 - Detecção de anticorpos IgG específicos a *G. duodenalis*

Os níveis de IgG específica a *G. duodenalis* foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de soro. Todos os passos necessários para determinar a IgG sérica foram previamente padronizados. Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar/Corning – 3590) foram sensibilizadas com 3 µg/well de extrato solúvel de *G. duodenalis* em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 (50 µL/poço) e incubadas por

18h a 4°C. As placas foram lavadas 3x com PBS – 0,05% Tween 20 (PBST) e bloqueadas por 2h a 37°C com 100 µL/well de PBS- Molico 5% (Nestlé Brasil LTDA) e em seguida, lavadas (3x) e incubadas com 100 µL/well de soro diluídos em 1:5 em PBS-Molico 1%, em duplicata, por 1h a 37°C. Após lavagem (6x), 50 µL/poço de anticorpo anti-IgG humana (Caltag Lab. Inc.) foram adicionados e incubados por 1h a 37°C. Logo depois, as placas foram lavadas (6x) e a reação foi revelada com o substrato OPD (orto-fenilenodiamina) em tampão citrato-fosfato a 0,1M, pH 5 contendo H₂O₂ a 30% e finalizada com H₂SO₄ 2N. Os valores de densidade óptica (D.O) foram mensurados em leitor de ELISA (Polaris- Celer) a 492 nm.

3.18 - Detecção de anticorpos IgA secretora específicos a *G. duodenalis*

Os níveis de IgA secretora específica a *G. duodenalis* foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de extrato fecal. Todos os passos necessários para determinar a IgA fecal foram previamente padronizados. Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar/Corning – 3590) foram sensibilizadas com 10 µg/mL por placa (50 µL/poço) com extrato solúvel de *G. duodenalis* diluídos em PBS e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas 3x com PBS – 0,05% Tween 20 (PBST) e bloqueadas por 1h a 37°C com 200 µL/well de PBS- Molico 5% (Nestlé Brasil LTDA) e, em seguida, lavadas (3x) e incubadas com 50 µL/poço de amostras de extrato fecal a 1:5 em PBS-Molico 1% em duplicata, por 2h a 37°C. Após lavagem (6x), 50 µL/poço de anticorpo biotinilado anti-IgA humana (Caltag Lab. Inc.) foram adicionados e incubados por 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas (6x) e 50 µL/poço de estreptavidina-peroxidase foram incubados por 30 min a 37° C. A reação foi revelada com o substrato TMB (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e finalizada com H₂SO₄ 2N. Os valores de densidade óptica foram mensurados em leitor de ELISA (Polaris- Celer) a 450 nm.

3.19 - Detecção de anticorpos IgA sérica específicos a *G. duodenalis*

Os níveis de IgA sérica específica a *G. duodenalis* foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de soro. Todos os passos necessários para determinar a IgA sérica, foram previamente padronizados. Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar/Corning – 3590) foram sensibilizadas com 3 µg/well (50 µL/poço) de extrato solúvel de *G. duodenalis* diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M e incubadas por 18h a

4°C. As placas foram lavadas 3x com PBS – 0,05% Tween 20 (PBST) e bloqueadas por 2h a 37°C com 100 µL/well de PBS- Molico 5% (Nestlé Brasil LTDA) e, em seguida, lavadas (3x) e incubadas com 50 µL/well de amostras de soro a 1:5 em PBS-Molico 1%, em duplicita, por 1h a 37°C. Após lavagem (6x), 50 µL/poço de anticorpo biotinilado anti-IgA humana (Caltag Lab. Inc.) foram adicionados e incubados por 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas (6x) e 50 µL/poço de estreptavidina-peroxidase foram incubados por 30 min a 37° C. A reação foi revelada com o substrato ABTS (KPL, Gaithersburg, MD, USA) em temperatura ambiente e câmara escura. Os valores de densidade óptica foram mensurados em leitor de ELISA a 405 nm.

3.20 – Extrato Solúvel de *D. pteronyssinus*

O extrato solúvel de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) foi obtido do kit de teste cutâneo de puntura (FDA Allergenic, Immunotech, Brasil). O conteúdo protéico foi determinado através do Método de Bradford (1976).

3.21 - Detecção de anticorpos IgE específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*

Os níveis de IgE sérica específica a *Dermatophagoides pteronyssinus* foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de soro. Todos os passos necessários para determinar a IgE sérica, foram previamente padronizados. Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar/Corning – 3590) foram sensibilizadas com 20 µg/mL por placa (50 µL/well) de extrato solúvel de *D. pteronyssinus* diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas 3x com PBS – 0,05% Tween 20 (PBST) e bloqueadas por 1h em temperatura ambiente com 150 µL/well de PBS-T-BSA 1% e, em seguida, lavadas (3x) e incubadas com 50 µL/well de amostras de soro a 1:2 em PBS-T-BSA 1%, em duplicita, por 2h a 37°C. Após lavagem (6x), 50 µL/well de anticorpo biotinilado anti-IgE humana (Caltag Lab. Inc.) foram adicionados e incubados por 1h a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (6x) e 50 µL/poço de estreptavidina-peroxidase foram incubados por 30 min em temperatura ambiente e câmara escura. A reação foi revelada com o substrato ABTS (KPL, Gaithersburg, MD, USA) em temperatura ambiente e câmara escura. Os valores de densidade óptica foram mensurados em leitor de ELISA a 405 nm.

3.22 - Análise Estatística

Nas comparações para duas proporções, foi utilizado o teste Qui-quadrado X^2 e em análises com freqüências esperadas menores do que cinco, foram utilizados os testes Exato de Fisher utilizando-se do programa computacional Epi Info 3. 5. 4 (DEAN et al., 2008). A concordância KAPPA foi calculada utilizando o programa computacional Bioestat 5.0 (Sociedade Civil Mamirauá, Brasil, 2007). A interpretação do coeficiente Kappa foi baseada em ROSNER (2011). Para quantificar a associação entre os possíveis fatores de risco à infecção por *Giardia duodenalis* e *Toxocara* sp., foi usada a Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95 %, utilizando-se do programa computacional Epi Info 3. 5. 4 (2012), onde as informações foram armazenadas e analisadas. Programa disponível no site www.cdc.gov/epiinfo. A confecção dos gráficos foi realizada pelo software GraphPad Prism, versão 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA), com estatística analisada por meio do teste ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

3.23 - Divulgação dos resultados e retorno para os pacientes

Os resultados dos testes cutâneos de puntura foram passados no momento do exame para as equipes de médicos pediatras responsáveis do HC. Todos os resultados dos exames de fezes e de sorologia (quando considerados relevantes após análise) foram repassados para os médicos que tomaram as providências cabíveis, como, por exemplo, tratamento dos casos positivos. Os resultados dos hemogramas eram acessados constantemente pelos médicos. Além dos resultados, todos os responsáveis receberam orientações sobre parasitos e melhorias no comportamento em relação a processos alérgicos.

4-Resultados

4.1 - Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica (HC-UFG)

O estudo foi realizado em 173 crianças (122 atópicas e 51 não atópicas) atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com a colaboração e supervisão do médico pediatra e professor Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo e da médica pediatra alergista Dra. Karla Pereira Fernandes. A maior parte das crianças pesquisadas residia no município de Uberlândia, sendo algumas de municípios próximos a Uberlândia como Nova Ponte e Araguari.

4.2 - Perfil sociodemográfico das crianças atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Considerando-se o total de crianças pesquisadas n=173, observou-se que a maioria eram do sexo masculino (62,4%) com idade média de 8,7 anos de idade, enquanto as meninas possuíam idade média de 9,3 anos de idade (Tabela 1).

Tabela1: Perfil demográfico referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	N	%
Idade	$8,97 \pm 2,59^a$	
Sexo		
Masculino	108	62,4
Feminino	65	37,6

a = média ± desvio padrão

Na tabela 2, estão representadas variáveis socioepidemiológicas referentes ao estilo de vida das famílias das crianças pesquisadas e também de variáveis comportamentais.

Tabela 2: Perfil socioepidemiológico referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	N	%
Residência		
Apartamento	5	2,9
Casa com quintal	150	86,7
Casa sem quintal	18	10,4
Possui cão ou gato		
Não	83	48
Sim (Cão)	79	45,7
Sim (Gato)	4	2,3
Sim (Cão e gato)	7	4
Local que o animal reside		
Dentro da residência	13	14,4
Fora da residência	68	76,7
Dentro e fora da residência	9	8,9
Local onde o animal defeca		
Fora da residência	87	96,7
Fora e dentro da residência	1	1,1
Liteiras	2	2,2
Animal vermifugado		
Sim	76	84,4
Não	14	15,6
Criança com geofagia		
Sim	11	6,4
Não	162	93,6
Criança com onicofagia		
Sim	88	50,9
Não	85	49,1
Frequência em caixas de areia de parques, praças e escolas		
Sim	118	68,2
Não	55	31,8
Parentes com alergia		
Sim	130	75,1
Não	43	24,9

Na tabela 3 estão listadas as variáveis clínicas. Em relação à pneumonia, das 59 crianças que tiveram a doença, as idades mais frequentes para manifestação ocorreram durante o primeiro ano de vida (5,2% dos casos) e entre cinco e seis anos de idade (4%). Sobre as manifestações cutâneas, de 70 crianças, a urticária apareceu em 69 (98,5%) e o edema em uma (1,5%). Não foram observados casos de hepatomegalia e esplenomegalia.

Tabela 3: Perfil clínico referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	N	%
Atopia		
Sim	122	70,5
Não	51	29,5
Tosse crônica		
Sim	50	28,9
Não	123	71,1
Pneumonia		
Sim	59	34,1
Não	114	65,9
Manifestação cutânea		
Sim	70	40,5
Não	103	59,5
Rinite (alérgica e não alérgica)		
Sim	98	56,6
Não	75	43,4
Dor abdominal		
Sim	76	43,9
Não	97	56,1
Náusea		
Sim	38	22
Não	135	78
Vômito		
Sim	37	21,4
Não	136	78,6

Perda de peso			
		N	%
Sim		17	9,8
Não		156	90,2
Diarreia			
Sim		19	11
Não		154	89

Na tabela 4 estão listadas as variáveis laboratoriais referentes aos exames de fezes e hemograma (eosinófilos). Foram pedidas três amostras de fezes em dias alternados para cada criança. Todas as crianças trouxeram a primeira amostra de fezes (n=173), 163 (94,2%) crianças trouxeram a segunda amostra de fezes e 145 (83,8%) trouxeram a terceira amostra de fezes.

Tabela 4: Perfil dos exames laboratoriais referente às 173 crianças pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	N	%
Consistência das fezes amostra 1		
Formadas	105	60,4
Semiformadas	26	15,1
Pastosas	34	19,8
Diarréicas	1	0,6
Líquidas	7	4,1
Consistência das fezes amostra 2		
Formadas	105	64,4
Semiformadas	23	14,1
Pastosas	28	17,2
Diarréicas	0	0
Líquidas	7	4,3
Consistência das fezes amostra 3		
Formadas	92	63,5
Semiformadas	23	15,8
Pastosas	19	13,1
Diarréicas	2	1,4
Líquidas	9	6,2
Eosinofilia		
Sim	50	28,9
Não	123	71,1

Valor absoluto de eosinófilos^b	428,28±369,77 ^a
Valor relativo de eosinófilos^b	6,4% ±4,19 ^a

a = média ± desvio padrão

b= Cell DYN 3700. HENRY, Jonh Bernard (1995).

Em relação ao teste cutâneo de puntura (*Prick test*), observamos que *Dermatophagoides pteronyssinus* é o alérgeno com maior frequência de positividade entre as crianças atópicas, seguido por *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*. Na maioria dos casos as crianças apresentaram positividade para mais de um alérgeno ao mesmo tempo (Tabela 5).

Tabela 5: Positividade dos diferentes alérgenos utilizados para caracterizar a atopia na realização do teste cutâneo de puntura (n=122 crianças).

Alérgenos	N	%
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	114	93,4
<i>Dermatophagoides farinae</i>	106	86,8
<i>Blomia tropicalis</i>	67	54,9
Epitélio de cão	18	14,7
<i>Periplaneta americana</i>	15	12,2
<i>Blatella germanica</i>	12	9,8
Epitélio de gato	11	9,0
Fungos do ar	9	7,3
Gramíneas mix	5	4
<i>Alternaria alternata</i>	2	1,6

4.3 - Soroprevalência de *Toxocara* sp. e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças atópicas:

Das crianças atópicas analisadas e diagnosticadas pelo método ELISA, 24 (19,7%) apresentaram soroprevalência positiva para *Toxocara* sp.. A média de idade para crianças positivas foi de $9,75 \pm 2,43$ anos. Crianças do sexo masculino (58,33%) mostraram-se mais positivas comparadas ao sexo feminino. A maioria das crianças positivas (87,5%) viviam em residências que possuíam quintal. Do total de crianças sorologicamente positivas, 66,6% (n=16) possuíam animais em casa. Dessas, 81,2% possuíam cães, 12,5% possuíam cães e gatos e 6,3% somente gatos. Em relação ao local em que o animal reside, 68,75% (n=11) desses animais residiam fora de casa, sendo que todos os animais (n=16) defecavam fora do ambiente interno residencial. Em relação aos animais das crianças sorologicamente positivas, 81,25% (n=13) eram vermifugados.

Em se tratando dos hábitos comportamentais das crianças sorologicamente positivas, observou-se que 91,6% (n=22) não praticavam geofagia, enquanto a onicofagia esteve presente na maioria das crianças positivas, sendo 54,1% delas (n=13). A frequência em caixas de areia de parques, praças públicas e escolas foi constatada em 66,6% das crianças positivas (n=16). Das variáveis mencionadas, nenhuma se mostrou associada à infecção ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
			N	%	N	%			
Idade		9,05 ± 2,56 ^b			9,75±2,43 ^b		8,88±2,57 ^b	p=0,14	ANOVA
Sexo									
Feminino	44	36,1	10	22,7	34	77,3	0,74(0,27-2,09)	p=0,68	Qui - quadrado
Masculino	78	63,9	14	17,9	64	82,1			
Residência									
Casa com quintal	111	91	21	18,9	90	81,1	1,6(0,25-7,42)	p=0,37	Exato de Fischer
Casa sem quintal	11	9	3	27,3	8	72,7			
Possui cão ou gato									
Sim	66	54,1	16	24,2	50	75,8	1,91(0,69-5,65)	p=0,25	Qui-quadrado
Não	56	45,9	8	14,3	48	85,7			
Local em que o animal reside									
Fora da residência	54	81,8	11	20,4	43	79,6	0,36(0,08-1,74)	p=0,12	Exato de Fischer
Dentro da residência	12	18,2	5	41,7	7	58,3			
Local em que o animal defeca									
Fora da residência	65	98,5	16	24,6	49	75,4	Indefinido	p=0,75	Exato de Fischer
Dentro da residência	1	1,5	0	0	1	100			
Animal vermifugado									
Sim	57	86,4	13	22,8	44	77,2	0,59(0,10-4,18)	p=0,37	Exato de Fischer
Não	9	13,6	3	33,3	6	66,7			

Criança com geofagia									
Sim	5	4,1	2	40	3	60	2,84(0,22-26,44)	p=0,25	Exato de Fischer
Não	117	95,9	22	18,8	95	81,2			
Criança com onicofagia									
Sim	66	54,1	13	19,7	53	80,3	1,0(0,37-2,74)	p=082	Qui-quadrado
Não	56	45,9	11	19,6	45	80,4			
Frequência em caixas de areia de parques, praças e escolas									
Sim	81	66,4	16	19,8	65	80,2	1,0(0,36-3,03)	p=0,83	Qui-quadrado
Não	41	33,6	8	19,5	33	80,5			

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b = média e desvio padrão da idade

4.4 - Soroprevalência de *Toxocara* sp. e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças atópicas:

Em relação a possíveis fatores hereditários vinculados às manifestações alérgicas em crianças atópicas, 82% (n=100) dessas crianças possuíam parentes com alguma alergia. Do total de crianças sorologicamente positivas para *Toxocara* sp. (n=24), 79,1% tinham parentes com alergia.

A respeito das variáveis clínicas nas crianças sorologicamente positivas, 37,5% (n=9) tinham tosse crônica, 29,1% (n=7) tiveram pneumonia, 33,3% (n=8) tinham manifestações cutâneas como a urticária, 70,8% (n=17) apresentavam rinite alérgica e 29,2% (n=7) apresentavam asma alérgica. Nos exames laboratoriais, foi verificado que a eosinofilia esteve presente em 50% (n=12) dos indivíduos com toxocaríase, com média de valor absoluto igual a $663,09 \pm 586,15$ (limite até 500 mm³) e média de valor relativo (%) igual a $9,15 \pm 6,15$. Nenhuma das crianças que apresentou sorologia positiva para toxocaríase apresentaram exames coproparasitológicos positivos para *G. duodenalis* e nem sinais clínicos de hepatomegalia ou esplenomegalia. Das variáveis mencionadas, nenhuma se mostrou associada à infecção ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7: Perfil clínico e laboratorial de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
			N	%	N	%			
Parentes com alergia									
Sim	100	82	19	19	81	81	0,79(0,24-3,11)	p=0,44	Exato de Fischer
Não	22	18	5	22,7	17	77,3			
Dor abdominal									
Sim	56	45,9	12	21,4	44	78,6	1,22(0,45-3,31)	p=0,82	Qui-quadrado
Não	66	54,1	12	18,2	54	81,8			
Tosse crônica									
Sim	35	28,7	9	25,7	26	74,3	1,65(0,56-4,63)	p=0,41	Qui-quadrado
Não	87	71,3	15	17,2	72	82,8			
Pneumonia									
Sim	42	34,4	7	16,7	35	83,3	0,74(0,23-2,11)	p=0,71	Qui-quadrado
Não	80	65,6	17	21,3	63	78,7			
Manifestações cutâneas									
Sim	51	41,8	8	15,7	43	84,3	0,64(0,21-1,76)	p=0,47	Qui-quadrado
Não	71	58,2	16	22,5	55	77,5			
Alergia respiratória (rinite)									
Sim	98	80,3	17	17,3	81	82,7	0,51(0,16-1,69)	p=0,15	Exato de Fischer
Não	24	19,7	7	29,2	17	70,8			
Alergia respiratória									

(asma)								
Sim	37	30,3	7	18,9	30	81,1	0,93(0,29-0,68)	p=0,91
Não	85	69,7	17	20	69	80		Qui-quadrado
Eosinofilia								
Sim	37	38,5	12	25,5	35	74,5	1,79(0,65-4,88)	p=0,29
Não	75	61,5	12	16	63	84		Qui-quadrado
Valor absoluto de eosinófilos^b	513,15±399,62		663,09±586,15		476,43±332,89		p=0,17	Mann-Whitney
Valor relativo de eosinófilos (%)^b	7,73±5,13		9,15±6,15		7,38±4,82		p=0,13	ANOVA
Resultado exame para <i>G.duodenalis</i>								
Positivo	7	5,7	0	0	7	100	Indefinido	
Negativo	115	94,3	24	20,9	91	79,1		Exato de Fischer

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b= Cell DYN 3700. HENRY, Jonh Bernard (1995).

4.5 – Determinação do Índice de Avidez dos anticorpos IgG anti*Toxocara* em crianças atópicas:

Das 122 crianças atópicas estudadas, 24(19,7%) obtiveram sorologia positiva para IgG anti*Toxocara*. Nestas amostras foi realizado o teste de avidez para verificar se a infecção era recente ou tardia. Em três amostras (12,5%) foi verificado índice de avidez menor que 50% (baixa avidez), o que indica infecção adquirida recentemente. Nessas amostras, também foi observada eosinofilia. Nas outras 21 amostras (87,5%), foi encontrado índice de avidez maior que 50%, indicando alta avidez e infecção adquirida há mais tempo, ou seja, crônica. Deste total, nove amostras (42,8%) apresentaram eosinofilia no hemograma. A média de idade das crianças com alta avidez foi de $9,95 \pm 2,45$ anos e nas crianças com baixa avidez a média foi de $8,33 \pm 2,08$ anos. Não houve associação estatística entre as variáveis eosinofilia, avidez e idade ($p > 0,05$).

4.6 - Soroprevalência de *Toxocara* sp. e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças não-atópicas:

Das crianças não atópicas analisadas, 8 (15,7%) apresentaram soroprevalência positiva para *Toxocara* sp. diagnosticadas pelo método ELISA. A média de idade para crianças positivas foi de $9,37 \pm 1,99$ anos. Em relação ao sexo, mesmo havendo mais meninos na população estudada, o número de crianças do sexo masculino e feminino sorologicamente positivos foi o mesmo (n=4 para cada). A maioria das crianças positivas (87,5%) viviam em residências que possuíam quintal. Do total de crianças sorologicamente positivas, 75% (n=6) possuíam animais em casa. Desses, 83,3% possuíam cães e 16,7% cães e gatos.

Metade das crianças com toxocaríase e que possuíam animais (n=3) disseram manter seus cães e gatos fora de do ambiente interno da casa. Entretanto, todos os animais, inclusive os de crianças sorologicamente negativas, defecavam em ambiente externo à casa. A vermiculação de animais foi verificada em 66,6% dos casos das crianças com sorologia positiva.

Em se tratando dos hábitos comportamentais das crianças sorologicamente positivas, observou-se que 87,5% (n=7) não praticavam geofagia, e que 75% (n=6) não praticavam a onicofagia.

A frequência em caixas de areia de parques, praças públicas e escolas foi constatada em 75% (n=6) das crianças positivas. Das variáveis mencionadas, nenhuma se mostrou associada à infecção ($p > 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 : Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
	N	%	N	%	N	%			
Idade		$8,78 \pm 2,69^b$		$9,37 \pm 1,99^b$		$8,67 \pm 2,80^b$		p=0,50	ANOVA
Sexo									
Feminino	21	41,2	4	19	17	81	0,65(0,10-4,05)	p=0,43	Exato de Fischer
Masculino	30	58,8	4	13,3	26	86,7			
Residência									
Casa com quintal	39	76,5	7	18,9	32	82,1	0,42(0,08-3,93)	p=0,38	Exato de Fischer
Casa sem quintal	12	23,5	1	8,3	11	91,7			
Possui cão ou gato									
Sim	24	47	6	25	18	75	4,0(0,63-45,5)	p=0,09	Exato de Fischer
Não	27	53	2	7,4	25	92,6			
Local que o animal reside									
Fora da residência	15	62,5	3	20	12	80	0,5(0,05-5,0)	p=0,39	Exato de Fischer
Dentro da residência	9	37,5	3	33,3	6	66,7			
Animal vermifugado									
Sim	19	79,2	4	21,1	15	78,9	0,41(0,03-6,60)	p=0,36	Exato de Fischer
Não	5	20,8	2	40	3	60			
Criança com geofagia									
Sim	6	11,8	1	16,7	5	83,3	1,0(0,02-12,18)	p=0,66	Exato de Fischer
Não	45	88,2	7	15,6	38	84,4			

Criança com onicofagia								
Sim	22	43,1	2	9,1	20	90,9	0,3(0,03-2,50)	p=0,23
Não	29	56,9	6	20,7	23	79,3		Exato de Fischer
Frequência em caixas de areia de parques, praças e escolas								
Sim	37	72,5	6	16,2	31	83,8	1,15(0,17-13,28)	p=0,61
Não	14	27,5	2	14,3	12	85,7		Exato de Fischer

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b = média e desvio padrão da idade

4.7 - Soroprevalência de *Toxocara* sp. e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças não atópicas:

Em relação a possíveis fatores hereditários, 58,8% (n=30) das crianças não atópicas possuem algum parente com alergia, entretanto, a maioria das crianças com sorologia positiva, 62,5% (n=5), não possuem parentes com qualquer manifestação alérgica.

A respeito das variáveis clínicas nas crianças sorologicamente positivas, 62,5 (n=5) apresentavam dor abdominal, 75% (n=6) tinham tosse crônica, e apenas 12,5% (n=1) apresentava pneumonia. A urticária ocorreu nas três crianças que apresentaram manifestação cutânea e com sorologia positiva (37,5%). Nas crianças não atópicas, 29,41% (n=15) apresentavam algum tipo de manifestação de origem não alérgica, entre elas: angioedema em 6,7% (n=1), asma em 6,7% (n=1), dermatite em 13,3% (n=2), dermatite e urticária em 6,7% (n=1), rinite em 46,7% (n=7), rinite e asma em 13,3% (n=2) e rinite, asma, dermatite e conjutivite em 6,7% (n=1).

No hemograma, foi verificado que a eosinofilia não esteve presente em 87,5% (n=7) dos indivíduos com toxocaríase, com média de valor absoluto igual a $284,6 \pm 215,3$ (limite até 500 mm³) e média de valor relativo (%) igual a $3,0 \pm 2,4$. Apenas uma criança (12,5%) com sorologia positiva para toxocaríase apresentou também exames coproparasitológicos positivos para *Giardia duodenalis*. Não foram observados sinais clínicos de hepatomegalia ou esplenomegalia em nenhuma das crianças. Das variáveis mencionadas, nenhuma mostrou-se associada à infecção ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9: Perfil clínico e laboratorial de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas sorologicamente para *Toxocara* sp. pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
			N	%	N	%			
Parentes com alergia									
Sim	30	58,8	3	10	27	90	0,36(0,04-2,15)	p=0,17	Exato de Fischer
Não	21	41,2	5	23,8	16	76,2			
Dor abdominal									
Sim	20	39,2	3	15	17	85	0,91(0,12-5,46)	p=0,61	Exato de Fischer
Não	31	60,8	5	16,1	26	83,9			
Tosse crônica									
Sim	15	29,4	2	13,3	13	86,7	0,77(0,06-5,12)	p=0,56	Exato de Fischer
Não	36	70,6	6	16,7	30	83,3			
Pneumonia									
Sim	18	35,3	1	5,6	17	94,4	0,22(0,04-2,0)	p=0,14	Exato de Fischer
Não	33	64,7	7	21,2	26	78,8			
Manifestações cutâneas									
Sim	19	37,3	3	15,8	16	84,2	1,0(0,13-6,04)	p=0,63	Exato de Fischer
Não	32	62,7	5	15,6	27	84,4			
Eosinofilia									
Sim	48	94,1	1	33,3	2	66,7	2,84(0,04-61,9)	p=0,40	Exato de Fischer
Não	75	61,5	7	14,6	41	85,4			
Valor absoluto de eosinófilos^b		225,25±155,77	284,6±215,3		214,2±142,6		p=0,24		ANOVA

Valor relativo de eosinófilos (%)^b	3,23±2,19	3,0±2,4	3,27±2,18	p=0,74	ANOVA
Giardíase					
Positivo	7	13,7	1	14,3	6
Negativo	44	86,3	7	15,9	37

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b= Cell DYN 3700. HENRY, Jonh Bernard (1995).

4.8 – Determinação do Índice de Avidez dos anticorpos IgG anti*Toxocara* em crianças não atópicas:

Das 51 crianças não atópicas estudadas, 8 (15,7%) obtiveram sorologia positiva para IgG anti*Toxocara*. Nestas amostras, foi realizado o teste de avidez para verificar se a infecção era recente ou tardia. Em todas as amostras (100%), foi verificado índices de avidez maior que 50%, o que indica alta avidez e infecção tardia, crônica. Deste total, sete amostras (87,5%) não apresentaram eosinofilia no hemograma. Não houve associação estatística entre as variáveis eosinofilia e avidez ($p > 0,05$).

4.9 - Prevalência de *Giardia duodenalis* e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças atópicas:

Das crianças atópicas analisadas, sete (5,7%) apresentaram positividade para *G. duodenalis* diagnosticadas pelo método Flutuação em sulfato de zinco (33%) de acordo com Faust (1939) (Figura 1). A média de idade das crianças positivas foi de $8,57 \pm 2,99$ anos. Crianças do sexo masculino (85,7%) mostraram-se mais positivas quando comparadas ao sexo feminino. Todas as crianças positivas (100%) viviam em residências que possuíam quintal e 85,7% ($n=6$) possuíam cães em casa. Todos esses cães residiam e defecavam fora do ambiente interno residencial. Em relação aos animais das crianças positivas, 83,3% ($n=5$) eram vermifugados. Nenhuma delas tinha gatos.

Em se tratando dos hábitos comportamentais das crianças positivas ($n=7$), observou-se que nenhuma delas praticavam geofagia, por outro lado, a onicofagia esteve presente na maioria das crianças positivas (71,4%). Das variáveis mencionadas, nenhuma se mostrou associada à infecção ($p > 0,05$) (Tabela 10).



Figura 1: Amostra de fezes de criança atópica com cistos de *Giardia duodenalis*. Método Flutuação em sulfato de zinco 33 % (Faust, 1939). Objetiva de 40 x. Coloração: lugol. Arquivo pessoal. Escala: 10 μm .

Tabela 10: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
	N	%	N	%	N	%			
Idade		9,05 ± 2,56 ^b		8,57±2,99 ^b		9,08±2,54 ^b		p=0,60	ANOVA
Sexo									
Feminino	44	36,1	1	2,3	43	97,7	3,55(0,40-168,5)	p=0,20	Exato de Fischer
Masculino	78	73,9	6	7,7	72	92,3			
Residência									
Casa com quintal	111	91	7	6,3	104	93,7	Indefinido	p=0,50	Exato de Fischer
Casa sem quintal	11	9	0	0	11	100			
Possui cão ou gato									
Sim	66	54,1	6	9,1	60	90,9	5,4(0,62-257,4)	p=0,08	Exato de Fischer
Não	56	45,9	1	1,8	55	98,2			
Local em que o animal reside									
Fora da residência	54	81,8	6	11,1	48	88,9	Indefinido	p=0,28	Exato de Fischer
Dentro da residência	12	18,2	0	0	12	100			
Local em que o animal defeca									
Fora da residência	65	98,5	6	9,2	59	90,8	Indefinido	p=0,90	Exato de Fischer
Dentro da residência	1	1,5	0	0	1	100			
Animal vermifugado									
Sim	57	86,4	5	8,8	52	91,2	0,77(0,07-40,87)	p=0,60	Exato de Fischer
Não	9	13,6	1	11,1	8	88,9			

**Criança com
geofagia**

Sim	5	4,1	0	0	5	100	Indefinido	p=0,74	Exato de Fischer
Não	117	95,9	7	6	110	94			

**Criança com
onicofagia**

Sim	66	54,1	5	7,6	61	92,4	2,1(0,34-23,9)	p=0,29	Exato de Fischer
Não	56	45,9	2	3,6	54	96,4			

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b = média e desvio padrão da idade

4.10 - Prevalência de *Giardia duodenalis* e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças atópicas:

Em relação a possíveis fatores hereditários, 82% (n=100) das crianças atópicas possuem algum parente com alergia, entretanto, a prevalência de *G. duodenalis* foi menor nesse grupo, com associação significante ($p = 0,01$) e OR = 0,14 (0,01-0,91), sendo considerada a presença de parentes próximos com alergia um fator de proteção contra a infecção por *G. duodenalis*.

A respeito das variáveis clínicas nas crianças parasitologicamente positivas, 57,1 (n=4) apresentavam dor abdominal, 28,5% (n=2) tinham náuseas e vômitos, e 14,2% (n=1) apresentavam diarreia. Nenhuma criança apresentava perda de peso. A urticária ocorreu em três crianças que apresentaram manifestações cutâneas e com exame parasitológico positivo (42,8%) e o angioedema e a dermatite em uma criança (14,2%). A asma alérgica ocorreu em uma criança (14,2%) e a rinite alérgica em 85,7% (n=6) das crianças positivas para giardíase.

Nos exames laboratoriais, foi verificado que a eosinofilia não esteve presente em 71,4% (n=5) dos indivíduos com giardíase, com média de valor absoluto igual a $395,02 \pm 305,16$ (limite até 500 mm^3) e média de valor relativo (%) igual a $6,28 \pm 4,77$. Nenhuma criança, que apresentou parasitologia positiva para giardíase apresentou, também, exames sorológicos positivos para *Toxocara* sp.. Nenhuma criança apresentou sinais clínicos de hepatomegalia ou esplenomegalia. As outras variáveis mencionadas não foram associadas à infecção ($p>0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11: Perfil clínico e laboratorial de crianças atópicas (n=122) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
			N	%	N	%			
Parentes com alergia									
Sim	100	82	3	3	97	97	0,14(0,01-0,91)	*p=0,01	Exato de Fischer
Não	22	18	4	18,2	18	81,8			
Dor abdominal									
Sim	56	45,9	4	7,1	52	92,9	1,6(0,25-11,48)	p=0,40	Exato de Fischer
Não	66	54,1	3	4,5	63	95,5			
Náusea									
Sim	24	19,7	2	8,3	22	91,7	1,68(0,15-11,1)	p=0,41	Exato de Fischer
Não	98	80,3	5	5,1	93	94,9			
Vômito									
Sim	24	19,7	2	8,3	22	91,7	1,68(0,15-11,1)	p=0,41	Exato de Fischer
Não	98	80,3	5	5,1	93	94,9			
Perda de peso									
Sim	10	8,2	0	0	10	100	Indefinido	p=0,54	Exato de Fischer
Não	112	91,8	7	6,3	105	93,8			
Diarreia									
Sim	14	11,5	1	7,1	13	92,9	1,30(0,02-12,1)	p=0,58	Exato de Fischer
Não	108	88,5	6	5,6	102	94,4			
Manifestações cutâneas									

Sim	51	41,8	3	5,9	48	94,1	1,0(0,14-6,49)	p=0,62	Exato de Fischer
Não	71	58,2	4	5,6	67	94,4			
Alergia respiratória (Asma)									
Sim	37	30,3	1	2,7	36	97,3	0,36(0,0-3,20)	p=0,31	Exato de Fischer
Não	85	69,7	6	7,1	79	92,9			
Alergia respiratória (Rinite)									
Sim	112	91,8	6	5,4	106	94,6	0,51(0,05-26,0)	p=0,45	Exato de Fischer
Não	10	8,2	1	10	9	90			
Eosinofilia									
Sim	47	38,5	2	4,3	45	95,7	0,62(0,05-4,01)	p=0,44	Exato de Fischer
Não	75	61,5	5	6,7	70	93,3			
Valor absoluto de eosinófilos^b	513,15±399,62			395,02±305,16			520,34±404,58		
Valor relativo de eosinófilos (%)^b	7,73±5,13			6,28±4,77			7,82±5,16		
								p=0,42	ANOVA
								p=0,44	ANOVA

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b= Cell DYN 3700. HENRY, Jonh Bernard (1995).

4.11 - Prevalência de *Giardia duodenalis* e análise de variáveis sociodemográficas e comportamentais associadas à infecção em crianças não atópicas:

Das 51 crianças não atópicas analisadas, sete (13,7%) apresentaram positividade para *Giardia duodenalis* diagnosticadas pelo método Flutuação em sulfato de zinco (33%) de acordo com Faust (1939) (Figura 2). Neste grupo de crianças foram encontradas formas císticas e trofozoíticas. A média de idade para crianças positivas foi de $9,42 \pm 2,43$ anos, sendo que crianças do sexo masculino (71,4%) mostraram-se mais positivas comparadas ao sexo feminino. Todas as crianças positivas (100%) viviam em residências que possuíam quintal, e 57,1% ($n=4$) possuíam animais em casa. Desses, 75% ($n=3$) eram crianças que tinham somente cães e 25% ($n=1$) cães e gatos. Desses animais, 75% residiam fora do ambiente interno residencial e todos defecavam fora da residência. Todos os animais das crianças positivas eram vermifugados.

Em se tratando dos hábitos comportamentais das crianças positivas ($n=7$), observou-se que nenhuma delas praticava geofagia, enquanto a onicofagia esteve presente em 28,5% ($n=2$) das crianças positivas. Das variáveis mencionadas, nenhuma se mostrou associada à infecção ($p > 0,05$) (Tabela 12).



Figura 2: Amostra de fezes de criança não atópica com cistos de *Giardia duodenalis*. Método Flutuação em sulfato de zinco 33 % (Faust, 1939). Objetiva de 40 x. Coloração: lugol. Arquivo pessoal. Escala: 10 μm .

Tabela 12: Perfil sóciodemográfico e comportamental de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
	N	%	N	%	N	%			
Idade		$8,78 \pm 2,69^b$		$9,42 \pm 2,43^b$		$8,68 \pm 2,74^b$		p=0,67	ANOVA
Sexo									
Feminino	21	41,2	2	9,5	19	90,5	1,87(0,27-21,7)	p=0,38	Exato de Fischer
Masculino	30	58,8	5	16,7	25	83,3			
Residência									
Casa com quintal	39	76,5	7	17,9	32	82,1	Indefinido	p=0,13	Exato de Fischer
Casa sem quintal	12	23,5	0	0	12	100			
Possui cão ou gato									
Sim	24	47	4	16,7	20	83,3	1,58(0,23-12,1)	p=0,43	Exato de Fischer
Não	27	53	3	11,1	24	88,9			
Local em que o animal reside									
Fora da residência	15	62,5	3	20	12	80	1,94(0,12-117,9)	p=0,51	Exato de Fischer
Dentro da residência	9	37,5	1	11,1	8	88,9			
Animal vermiculado									
Sim	19	79,2	4	21,1	15	78,9	Indefinido	p=0,36	Exato de Fischer
Não	5	20,8	0	0	5	100			
Criança com geofagia									
Sim	6	11,8	0	0	6	100	Indefinido	p=0,39	Exato de Fischer

Não	45	88,2	7	15,6	38	84,4		
Criança com onicofagia								
Sim	22	43,1	2	9,1	20	90,9	0,48(0,04-3,37)	p=0,34 Exato de Fischer
Não	29	56,9	5	17,2	24	82,8		

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b = média e desvio padrão da idade

4.12 - Prevalência de *Giardia duodenalis* e análise de variáveis clínicas e laboratoriais associadas à infecção em crianças não atópicas:

Em relação a possíveis fatores hereditários, 58,8% (n=30) das crianças não atópicas possuem algum parente com alergia; além disso, 51,7% (n=4) das crianças positivas para *G. duodenalis* relataram que têm parentes com manifestação alérgica.

A respeito das variáveis clínicas nas crianças parasitologicamente positivas, 57,1 (n=4) apresentavam dor abdominal, 28,5% (n=2) tinham náusea, 42,8% (n=3) vômitos e apenas 14,2% (n=1) apresentava diarreia. Nenhuma criança apresentava perda de peso. A urticária ocorreu em três crianças que apresentaram manifestação cutânea e com parasitológico positivo (42,8%).

Nos exames laboratoriais, foi verificado que a eosinofilia não esteve presente em nenhum dos indivíduos com o parasita. A média de valor absoluto de eosinófilos em crianças positivas foi igual a $179,22 \pm 106,55$ (limite até 500 mm^3) e média de valor relativo (%) igual a $2,55 \pm 1,03$. Do total de crianças com parasitologia positiva 14,2% (n=1) também apresentaram exame sorológico positivos para *Toxocara* sp.. Nenhuma criança apresentou sinais clínicos de hepatomegalia ou esplenomegalia. As variáveis mencionadas não foram associadas à infecção ($p>0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13: Perfil clínico e laboratorial de crianças não atópicas (n=51) positivas e negativas parasitologicamente para *Giardia duodenalis* pesquisadas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período novembro de 2011 a março de 2013.

Variáveis	Número	Frequência	Positivos		Negativos		OR (IC 95%) ^a	p-valor*	Teste estatístico
			N	%	N	%			
Parentes com alergia									
Sim	30	58,8	4	13,3	26	86,7	0,92(0,13-7,08)	p=0,61	Exato de Fischer
Não	21	41,2	3	14,3	18	85,7			
Dor abdominal									
Sim	20	39,2	3	15	17	85	1,18(0,15-7,99)	p=0,57	Exato de Fischer
Não	31	60,8	4	12,9	27	87,1			
Náusea									
Sim	14	27,5	2	8,3	22	91,7	1,0(0,09-7,67)	p=0,62	Exato de Fischer
Não	37	72,5	5	5,1	93	94,9			
Vômito									
Sim	13	25,5	3	23,1	10	76,9	2,49(0,31-17,6)	p=0,24	Exato de Fischer
Não	38	74,5	4	10,5	34	89,5			
Perda de peso									
Sim	7	13,7	0	0	7	100	Indefinido	p=0,33	Exato de Fischer
Não	44	86,3	7	15,9	37	84,1			
Diarreia									
Sim	5	9,8	1	20	4	80	1,64(0,02-21,0)	p=0,53	Exato de Fischer
Não	46	90,2	6	13	40	87			
Manifestações									

cutâneas								
Sim	19	37,3	3	15,8	16	84,2	1,30(0,16-8,82)	p=0,52
Não	32	62,7	4	12,5	28	87,5		Exato de Fischer
Eosinofilia								
Sim	3	5,9	0	0	3	100	Indefinido	p=0,63
Não	48	94,1	7	14,6	41	85,4		Exato de Fischer
Valor absoluto de eosinófilos^b	225,25±155,77		179,22±106,55		232,57±161,96		p=0,40	ANOVA
Valor relativo de eosinófilos (%)^b	3,23±2,19		2,55±1,03		3,34±2,31		p=0,38	ANOVA
Soropositividade								
Sim	8	15,7	1	12,5	7	87,5	0,88(0,01-9,34)	P=0,69
Não	43	84,3	6	14	37	86		ANOVA

a = OR, Odds Ratio, IC, Intervalo de confiança

b= Cell DYN 3700. HENRY, Jonh Bernard (1995).

4.13 – Análise dos níveis de IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* entre indivíduos positivos e negativos para *Toxocara* sp. e *Giardia duodenalis*.

Na comparação entre os níveis de IgE específica para *D. pteronyssinus* entre indivíduos sorologicamente positivos e negativos para *Toxocara* sp. (Figura 3), verificou-se que não houve diferença estatisticamente significante, ou seja, os níveis de IgE não apresentaram-se significativamente maiores ou menores nos indivíduos parasitados. Não foram encontrados também correlação entre os níveis de IgE específica para *D. pteronyssinus* e IgG anti*Toxocara* em nenhum dos grupos.

Indivíduos sorologicamente positivos e negativos para *Toxocara* sp. e atópicos tiveram níveis maiores de IgE específica do que indivíduos não atópicos positivos e negativos para *Toxocara* sp.. Índivíduos atópicos e sorologicamente negativos para *Toxocara* sp. tiveram níveis maiores de IgE quando comparados a indivíduos sorologicamente negativos para *Toxocara* sp., na amostra geral. Índivíduos sorologicamente positivos e negativos para *Toxocara* sp., na amostra geral, tiveram níveis maiores de IgE quando comparados a indivíduos não atópicos e sorologicamente negativos para *Toxocara* sp., sendo todos os resultados estatisticamente significantes.

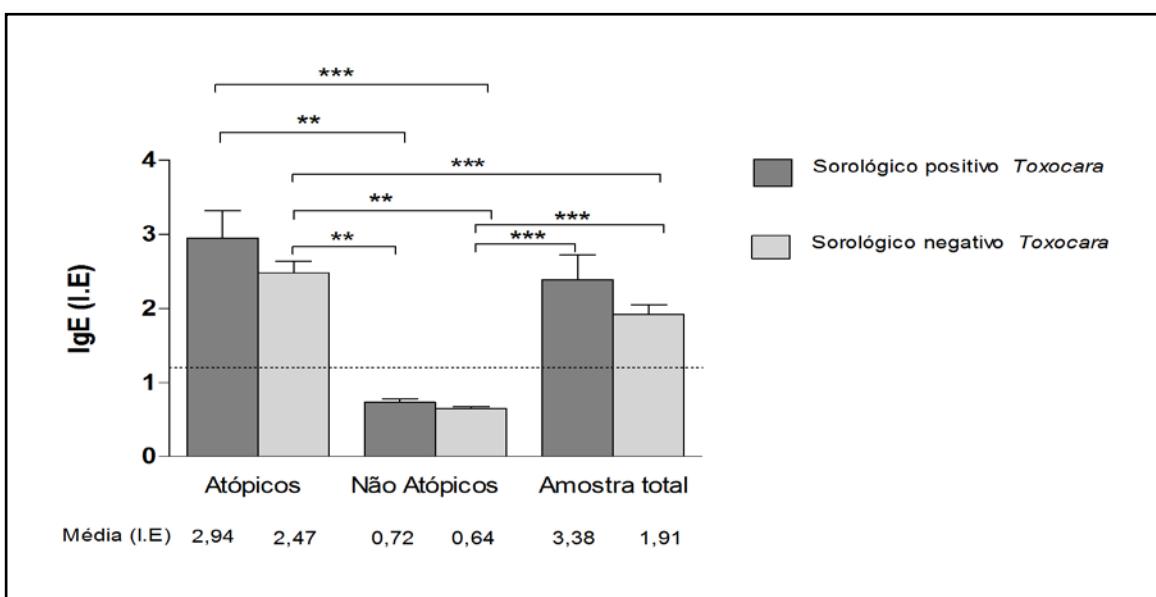


Figura 3: Comparação dos níveis de IgE específica ao extrato alergênico de *D. pteronyssinus* (Dpt) entre indivíduos sorologicamente positivos e negativos para *Toxocara* sp. e entre os grupos atópicos, não atópicos e amostra geral. As linhas pontilhadas indicam o limiar de positividade (I.E>1,2). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Barras mostram a média ± EPM (erro padrão da média).

Na comparação entre os níveis de IgE específica para Dpt entre indivíduos positivos e negativos para *G. duodenalis* (Figura 4), verificou-se que os níveis de IgE não apresentaram-se significativamente maiores ou menores nos indivíduos parasitados, ou seja, não houve diferença estatisticamente significante. Não foram encontrados, também, correlação entre os níveis de IgE para Dpt e IgA sérica, IgA fecal e IgG anti*Giardia*, em nenhum dos grupos.

Indivíduos atópicos positivos e negativos para *G. duodenalis* tiveram níveis maiores de IgE do que indivíduos não atópicos e negativos para *G. duodenalis*. Índivíduos atópicos e negativos para *G. duodenalis* tiveram níveis maiores de IgE quando comparados a indivíduos positivos e negativos para *G. duodenalis* na amostra geral. Índivíduos negativos para *G. duodenalis*, na amostra geral, tiveram níveis maiores de IgE quando comparados a indivíduos não atópicos e negativos para *G. duodenalis*. Todos esses resultados foram estatisticamente significantes.

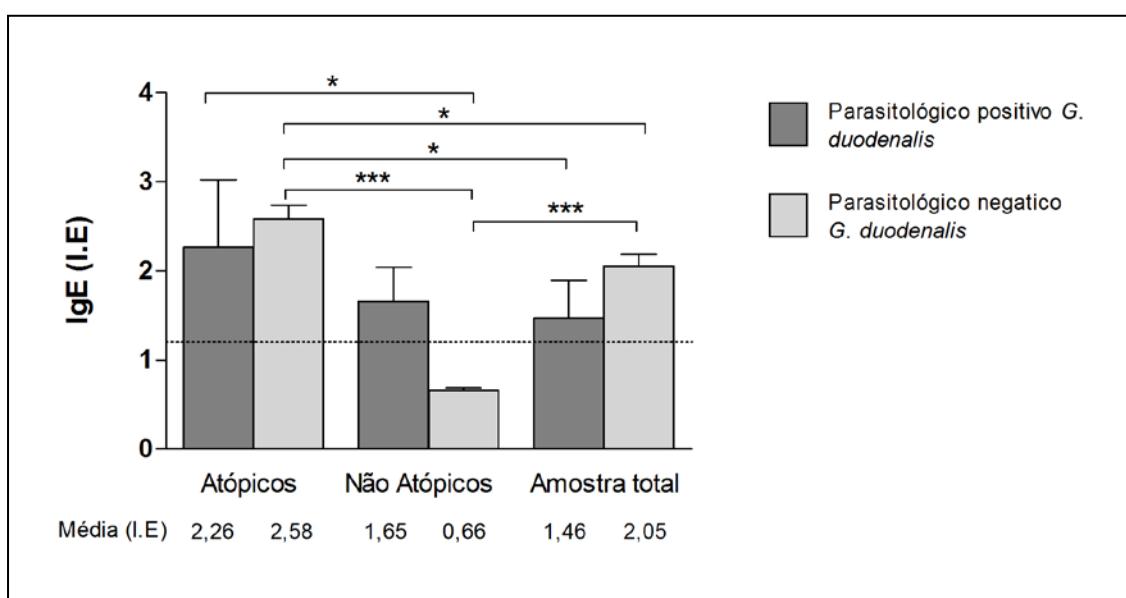


Figura 4: Comparação dos níveis de IgE específica ao extrato alergênico de *D. pteronyssinus* (Dpt) entre indivíduos positivos e negativos para *Giardia duodenalis* e entre os grupos atópicos, não atópicos e amostra geral. As linhas pontilhadas indicam o limiar de positividade ($I.E > 1,2$). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). Barras mostram a média \pm EPM (erro padrão da média).

4.14- Concordância entre os métodos sorológicos IgA sérica anti*Giardia*, IgA fecal anti*Giardia* e IgG anti*Giardia* e comparação dos exames coproparasitológicos para *G. duodenalis* com os exames sorológicos

Em se tratando da amostra total, observou-se que a IgA fecal anti*Giardia* e a IgG sérica anti*Giardia* concordaram nos resultados em 85 casos, com Kappa de concordância de 0,008. A IgA fecal anti*Giardia* e a IgA sérica anti*Giardia* concordaram em 87 casos , com Kappa de concordância de 0,07. A IgA sérica anti*Giardia* e a IgG sérica anti*Giardia* concordaram em 121 casos, apresentando Kappa igual a 0,26.

No grupo de pacientes atópicos observou-se que a IgA fecal anti*Giardia* e a IgG sérica anti*Giardia* concordaram nos resultados em 67 casos, com Kappa de concordância de 0,1. A IgA fecal anti*Giardia* e a IgA sérica anti*Giardia* concordaram em 67 casos , com Kappa de concordância de 0,1. A IgA sérica ant*Giardia* e a IgG sérica anti*Giardia* concordaram em 90 casos, apresentando Kappa igual a 0,3.

No grupo de pacientes não atópicos, observou-se que a IgA fecal anti*Giardia* e a IgG sérica anti*Giardia* concordaram nos resultados em 18 casos, com Kappa de concordância de 0,06. A IgA fecal anti*Giardia* e a IgA sérica anti*Giardia* concordaram em 20 casos , com Kappa de concordância de 0,02. A IgA sérica anti*Giardia* e a IgG sérica anti*Giardia* concordaram em 37 casos, apresentando Kappa igual a 0,03.

Restringindo a análise para somente o grupo com exames coproparasitológicos positivos para *G. duodenalis* (n=14), observamos que a IgG sérica anti*Giardia* esteve presente em todos casos, a IgA sérica anti*Giardia*, em 12 casos e a IgA fecal anti*Giardia*, em cinco casos.

Tabela 14: Amostras positivas para *Giardia duodenalis* de acordo com exame parasitológico (Faust, 1939) realizado nas fezes de crianças que participaram do estudo no período de novembro de 2011 a março de 2013.

Número de crianças diagnosticadas com <i>Giardia duodenalis</i> (diagnóstico padrão-ouro)														
ELISA														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
IgG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IgA sérica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
IgA fecal	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-

Indivíduos atópicos representados de 1 a 7 e indivíduos não atópicos representados de 8 a 14.

5-Discussão

O interesse sobre a interação entre parasitoses e manifestações alérgicas tem sido foco de diversas pesquisas como nos trabalhos de Gonzales-Quintela et al. (2006), Kustimur et al. (2007), Mendonça et al. (2012) e Souza et al. (2012). Alguns autores relatam aumento da incidência de pessoas com problemas alérgicos nas últimas décadas, principalmente nas grandes cidades (Von MUTIUS et al., 1998), outros relatam altas soroprevalências para *Toxocara* sp. (FIGUEIREDO et al., 2005; MENDONÇA et al., 2012) e também altas prevalências de protozoários como *Giardia duodenalis* (SOUZA et al., 2012) relacionando esses dois fatores: alergias e parasitoses.

A relação entre atopia e infecções helmínticas ou por protozoários é controversa. Estudos indicam que manifestações alérgicas ocorrem com maior frequência ou de maneira exacerbada em indivíduos soropositivos para *Toxocara* sp. (BUIJS et al., 1997); por outro lado, outros pesquisadores apoiam uma supressão no desenvolvimento de doenças alérgicas em indivíduos infectados com helmintos (FALLON; MANGAN, 2007). Em se tratando de *G. duodenalis*, existem relatos de associação entre o protozoário e manifestações alérgicas como rinite, asma alérgica e alergias alimentares (DI PRISCO et al., 1998), entretanto Souza et al. (2012) não encontraram relação.

A soroprevalência geral encontrada neste estudo para *Toxocara* sp. (18,5%) foi semelhante ao desenvolvido por Anaruma et al. (2001) e inferior aos estudos de Alderete et al. (2003) e Figueiredo et al. (2005), todos no Brasil. Em pesquisa realizada por Teixeira et al. (2006), nesta mesma região (Uberlândia), em crianças, independente de serem atópicas ou não, a soroprevalência encontrada foi menor, sendo que a faixa etária do grupo analisado envolvia crianças de um a 15 anos de idade. Diferenças na soroprevalência podem ocorrer devido a amostras com características diferentes.

Um dos propósitos deste estudo foi determinar possível associação entre a toxocaríase humana e atopia numa população de crianças, entretanto, nesta investigação, não foi observada associação. Os resultados encontrados foram diferentes dos observados por outros pesquisadores, como Buijs et al. (1994) e Buijs et al. (1997), ambos na Holanda, que encontraram associação significante entre a soroprevalência de *Toxocara* sp e asma atópica em crianças. É importante ressaltarmos que a maioria dos trabalhos entre toxocaríase e alergia está direcionado unicamente para a asma (CHAN et al., 2001; FERNANDO et al., 2009; KUK et al., 2006; KUSTIMUR et al., 2007; SHARGHI et al., 2001), o que difere deste trabalho que inclui amostra de crianças atópicas com alergias respiratórias como asma e rinite, doenças crônicas como a pneumonia e manifestações cutâneas, promovendo uma comparação da positividade para toxocaríase com alterações alérgicas em geral. O atual estudo indica

soroprevalência considerável da toxocaríase humana em crianças atópicas, resultados semelhantes ao trabalho realizado na Malásia por Chan et al. (2001) os quais encontraram prevalência de 21,2% em crianças com asma e sem nenhuma associação significativa com a idade, sexo, presença de cães ou gatos em casa e o tipo de residência.

Fatores como idade e sexo não se mostraram associados à infecção, assim como foi observado por Teixeira et al. (2006). A média de idade das crianças positivas atópicas e não atópicas foi em torno de nove anos, o que corrobora com a faixa etária (8 meses a 10 anos de idade) de maior prevalência, observada por Roldán et al. (2010). Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos estudos de Lynch et al. (1993), Mendonça et al. (2012) e Roldán et al. (2010), e sugerindo ser este grupo etário que tem maior contato com o parasita. Assim como em outras pesquisas (LYNCH et al., 1993; ROLDÁN et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2006), crianças do sexo masculino mostraram-se mais positivas, o que pode indicar diferenças no comportamento durante brincadeiras ou no convívio com o ambiente, resultando num aumento à exposição de ovos de *Toxocara* sp. (GLICKMAN; SHANTS, 1981; TEIXEIRA et al., 2006; OVERGAAUW, 1997).

A maioria das crianças infectadas possuíam cães ou gatos em casa, entretanto ter animais não se mostrou associado com a infecção em ambos os grupos, o que corrobora com os estudos de Glickman, Cypess (1977) e Jacobs et al. (1977) que também não encontraram associação entre a infecção e proprietários ou profissionais que trabalham com cães. Mattia et al. (2012) e Roldán et al. (2010) também não encontraram associação entre toxocaríase e a presença de cães e ou gatos em casa, no entanto Magnaval et al. (2001) e Teixeira et al. (2006) mencionam uma relação. Ter quintal ou não nas residências, não apresentou relação com a infecção em ambos os grupos estudados. A presença de areia, terra ou cimento no peridomicílio são características que podem influenciar na aquisição da toxocaríase humana. Além disso, um dos fatores que podem aumentar os riscos de infecção no peridomicílio é a presença de cães e gatos. Características relacionadas aos cuidados com estes animais, como local onde animal convive, defeca e os cuidados veterinários (vermifragação), são importantes no estudo da transmissão da toxocaríase, apesar de serem fatores pouco abordados nos trabalhos epidemiológicos. Neste estudo, esses fatores não estiveram relacionados à infecção, pois a maioria dos animais residiam e defecavam em ambiente residencial externo e, de acordo com os relatos dos donos, recebiam a vermiclagação, o que pode contribuir para redução da transmissão da toxocaríase humana.

De forma geral, não foi encontrado, nesta pesquisa, diferença estatística entre a infecção e hábitos como geofagia, onicofagia e hábitos de frequentar caixas de areia de

parques, praças e escolas, assim como no trabalho de Mattia et al. (2012). A maioria das crianças tanto atópicas como não-atópicas brincava, em locais públicos com terra ou areia. Durante o estudo foi observada certa dificuldade dos pais ou responsáveis em responder esta questão, pois na maioria das vezes as crianças não ficam com os pais a maior parte do tempo, permanecendo na escola ou sob cuidados de outras pessoas. Figueiredo et al. (2005) também relataram dificuldade em obter informações precisas nestes aspectos, não encontrando associação entre onicofagia e geofagia com a toxocaríase. Porém, o contato com o solo foi relatado pelo mesmos autores como fator associado à infecção, sugerindo que ovos de *Toxocara* podem estar presentes nesses locais e ser fonte de infecção por meio do contato entre os dedos e a boca. Nesse estudo a maioria das crianças com sorologia positiva, independente de serem atópica ou não, brincavam em locais públicos com areia ou terra.

Na literatura, não há dados que relacionem a presença de alergias em parentes próximos das crianças com a positividade para toxocaríase nestas, não sendo encontrado relação estatística entre essas variáveis neste estudo. Estudos como os de Kuk et al. (2006), Mendonça et al. (2012) e Sharghi et al. (2001) também não encontraram relação entre a toxocaríase e a presença de alergias em parentes. Ressalta-se que esses trabalhos focam a presença de parentes somente com sinais clínicos de asma.

Dores abdominais e tosse crônica não foram associados à infecção nos grupos de estudo, bem como nos estudos de Figueiredo et al. (2005), Mattia et al. (2012), Roldán et al. (2010) e Teixeira et al. (2006). Achados clínicos, como pneumonia, rinite ou manifestações cutâneas não foram associados à infecção, corroborando com achados de Figueiredo et al. (2005). Diferentemente, em pesquisa realizada no Peru por Roldán et al. (2010), encontraram associação entre manifestações pulmonares, como síndrome asmática, bronquite ou tosse seca e toxocaríase.

Inúmeros estudos têm sido realizados entre asma e toxocaríase como nos trabalhos de Chan et al. (2001), Fernando et al. (2009), Kuk et al. (2006), Kustimur et al. (2007), Muñoz-Guzmán et al. (2010) e Sharghi et al. (2001). No presente trabalho, não houve relação estatística entre essas duas variáveis, contrariando os estudos de Chan et al. (2001), Buijs et al. (1997) e Figueiredo et al. (2005), que sugeriram ocorrer relação entre o desenvolvimento da asma em crianças e infecção por *Toxocara*. Em pesquisa desenvolvida por Buijs et al. (1997), com crianças do ensino fundamental, foi demonstrado associação entre asma e bronquite com soroprevalência para *Toxocara*. Segundo os autores, parasitos como *Toxocara*, que induzem a produção de IgE, resultam em estimulação não específica de manifestações alérgicas em crianças propensas à atopia. Por outro lado, corroborando com o presente estudo,

pesquisadores como Gonzalez-Quintela et al. (2006) e Sharghi et al. (2001) também não encontraram associação entre a soroprevalência de *Toxocara* e manifestações alérgicas como a asma e a bronquite crônica.

Alterações hematológicas como a eosinofilia têm sido relatadas em alguns trabalhos sobre a toxocaríase (FIGUEIREDO et al, 2005). Em pesquisa com crianças do ensino fundamental realizada por Buijs et al. (1997), foi observado número de eosinófilos muito maior em crianças sorologicamente positivas para *Toxocara* comparada com as sorologicamente negativas, entretanto neste trabalho, não foi observado associação, concordando com Anaruma Filho et al. (2002) e Teixeira et al. (2006). Nenhuma das crianças envolvidas nesse estudo apresentou sinais de hepato ou esplenomegalia. Figueiredo et al. (2005) e Roldán et al. (2010) encontraram significativa relação entre toxocaríase e manifestações hepáticas, entretanto sem nenhuma relação com esplenomegalia.

De acordo com Dziemian et al. (2008), a avidez dos anticorpos IgG específicos para toxocaríase humana aumentam com o tempo após a exposição ao antígeno. A avaliação do grau de avidez pode ser usado para discriminar entre infecções recentes (agudas) e tardias (crônicas). Em estudo realizado pelos mesmos pesquisadores, 94,2% dos soros positivos, coletados de pacientes com toxocaríase há mais de seis meses, tiveram valores altos de avidez para IgG, enquanto 25,9% dos soros positivos de pacientes com menos de seis meses de infecção tiveram baixos índices de avidez para IgG. Segundo os autores, essa baixa porcentagem, em infecções com menor tempo, reflete que a precisão do momento de infecção não pode ser determinada precisamente pelos pacientes, pois os sintomas são inespecíficos e não tão evidentes, ou seja, esses pacientes na verdade podem ter adquirido a toxocaríase há mais tempo e assim apresentarem alta avidez. No presente estudo, os pacientes foram escolhidos de forma aleatória, sem terem o pré-requisito de ser previamente positivos para toxocaríase como no trabalho supracitado, e, mesmo nos pacientes que foram considerados posteriormente positivos, não obtivemos informações sobre o tempo preciso da infecção para comparar com os resultados encontrados em termos de baixa e alta avidez e verificar se realmente há uma concordância entre a avidez e o tempo de infecção. Segundo Hubner et al. (2001), o ensaio ELISA detecta os anticorpos por meses ou até anos após a infecção, razão pela qual se torna importante a realização do teste de avidez para diferenciar entre fase aguda e crônica. Outro fator importante na diferenciação entre fase aguda e crônica seria no tratamento da toxocaríase, que consiste no uso do albendazol e mebendazol. Em determinadas doses, esses medicamentos podem ser benéficos para a fase ativa da doença, porém para pacientes na fase crônica, a intervenção cirúrgica pode ser mais eficiente evitando

danos à saúde (CDC, 2015). No estudo de Hubner et al. (2001), em 1.376 doentes, foram encontradas apenas 5,09% de indivíduos com baixa avidez, o que significa que a maior parte dos pacientes estavam na fase crônica, corroborando com o nosso estudo, no qual os pacientes sorologicamente positivos para toxocaríase apresentaram, na maioria, alta avidez, portanto, fase crônica da infecção.

Em relação aos níveis de IgE específica para alérgenos inalados, Buijs et al. (1997) encontraram associação significante entre IgE específica e a soroprevalência positiva para *Toxocara* sp., indicando que esse parasito estimula a produção de IgE específica para alérgenos resultando em manifestações alérgicas em crianças propensas a atopia. Gonzalez-Quintela et al. (2006) também encontraram que a prevalência de IgE específica para aeroalérgenos foi maior em indivíduos sorologicamente positivos para *Toxocara* sp. do que em indivíduos negativos. Entretanto, Buijs et al. (1994), em estudo realizado em Roterdã, não encontraram relação entre os níveis de IgE específica para alérgenos inalados e a soropositividade para *Toxocara* sp., corroborando com este estudo. Em estudo com outro ascaridídeo em crianças atópicas realizado por Alcantara-Neves et al. (2011) no Brasil, também não foi encontrado associação entre *Ascaris lumbricoides* e IgE para aeroalérgenos. Araújo et al. (2000) também não encontraram associação entre IgE para aeroalérgenos e *Schistosoma mansoni*, mas observaram que os níveis de IgE foram maiores no grupo de indivíduos sem *S. mansoni*. De fato, neste atual estudo, valores significativos de IgE foram encontrados quando indivíduos atópicos foram comparados a indivíduos não atópicos ou à amostra geral, ou quando a comparação foi realizada entre amostra geral e indivíduos não atópicos, independentemente da sorologia para *Toxocara* sp., ou seja, a produção de IgE específica para Dpt é consequência da disposição alérgica e não da infecção por *Toxocara* sp. nesses grupos estudados.

A resposta imune à infecção por helmintos compartilha características com a resposta alérgica. Em particular, ambos são tipificados pela maior resposta do tipo Th2, produção de interleucinas, acompanhados por eosinofilia e abundante produção de IgE. Estudos epidemiológicos conduzidos em várias regiões do mundo mostram que infecções com *Toxocara* sp., estão sob diferentes circunstâncias associadas positivamente com atopia como nos trabalhos supracitados anteriormente. Contudo, outro estudo como de Araújo et al. (2000) demonstraram associação inversa ou reduzida entre parasitos com helmintos e atopia. Os autores relataram haver maior probabilidade de atopia em indivíduos não infectados, com associação inversa entre o teste cutâneo de leitura (*Prick teste*, incluindo Dpt), e a infecção por *S. mansoni*. Concluíram também que reações de hipersensibilidade imediata podem ser

suprimidas em indivíduos infectados com o parasito. Lynch et al. (1993) estudaram crianças carentes em Caracas, Venezuela, e observaram que aquelas tratadas com anti-helmínticos desenvolveram maior reatividade ao teste cutâneo e maiores níveis de IgE específica para alérgenos ambientais em contraste com crianças que não receberam o tratamento; a reatividade ao teste cutâneo diminuiu assim como a carga parasitária aumentou. Segundo Yazdanbakhsh et al. (2001), infecções por helmintos amortecem ativamente a atopia, embora seja possível que a predisposição genética torne certos indivíduos mais suscetíveis à infecção por helmintos e menos susceptíveis de desenvolver alergias.

O atual estudo não aponta uma associação menor ou maior entre atopia e toxocaríase, mas uma ausência de associação em ambos os grupos. Desse modo, a controvérsia continua e mais estudos são necessários para se chegar a respostas mais concisas. Se, por um lado, muitos estudos têm sido realizados com helmintos e alergias respiratórias, por outro, pouco tem se estudado sobre protozoários como *G. duodenalis* e esse tipo de alergia específica.

A prevalência geral para *Giardia duodenalis* encontrada neste estudo (8,09%) foi semelhante a de Fonseca et al. (2014) que encontraram positividade para *G. duodenalis* entre 4,8% e 10,5% em crianças com melhores condições de abastecimento de água, sendo este estudo também realizado em Minas Gerais. Entretanto, nossos resultados foram menores quando comparados aos de Castro et al. (2015) que encontraram prevalência de 44% para *G. duodenalis* em crianças em região próxima a Uberlândia. Santos et al. (2012) observaram prevalência de 51,8% em crianças atendidas em creches em Araguari, município próximo de Uberlândia. Provavelmente, a menor prevalência para o parasito encontrado em Uberlândia ocorre devido às boas condições sanitárias e de abastecimento de água que o município oferece (Instituto Trata Brasil, 2013). Fonseca et al. (2014) concluíram que aquelas crianças cujo abastecimento de água é proveniente de fontes sem proteção sanitária, incluindo rios, nascentes e represas têm maiores índices de infecção por *G. duodenalis*. É importante ressaltar que não somente a água está relacionada com parasitoses, mas também com hábitos de higiene (FONSECA et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

Em se tratando da prevalência de *G. duodenalis* em pacientes com alergias respiratórias, existe apenas um trabalho desenvolvido no Brasil por Souza et al. (2012) no qual os autores relataram que a presença de sintomas de asma e rinite alérgica, atopia cutânea e marcadores sorológicos como IgE não foram associados com a presença da infecção pelo parasito, corroborando com este estudo. Nesse trabalho, das 110 crianças analisadas, 45% estavam infectadas por *G. duodenalis* e dessas positivas, 54% tiveram prick test positivo. Se levarmos em conta os indivíduos não atópicos e os atópicos, pouco mais de 50% das crianças

estavam infectadas com *G. duodenalis*, o que difere dos nossos resultados que tiveram 5,7% de prevalência no grupo dos atópicos e 13,7% no grupo dos não atópicos. É fundamental destacarmos que o estudo de Souza et al. (2012) foi conduzido em amostra de população carente de uma região urbana do nordeste brasileiro, o que pode influenciar nos índices de infecção.

No estudo de Souza et al. (2012), não foram analisadas variáveis sociodemográficas, comportamentais e de perfil clínico como os colocados nos resultados deste trabalho. A associação entre a infecção por *G. duodenalis* e o aumento da prevalência de alergias cutâneas e alimentares vêm sendo discutidos (DI PRISCO et al., 1993; DI PRISCO et al., 1998; GIACOMETTI et al., 2003;), entretanto a associação com alergias em geral do trato respiratório é pouco abordada, o que dificulta fazermos análise crítica, comparativa e com respaldo em outras pesquisas. Neste estudo, nos detivemos principalmente em analisar possível associação entre indivíduos atópicos e parasitoses, como a giardíase, no entanto sem nenhum resultado favorável para tal associação.

A média de idade para crianças positivas variou entre seis e 10 anos, apesar de não ser significativo tanto no grupo atópicas como não atópicas. Em estudo realizado por Younas et al. (2008), a taxa de infecção também foi maior na faixa etária entre seis e 10 anos. Segundo o autor, crianças, nessa faixa etária, são totalmente independentes em relação à higiene e estão mais envolvidas em atividades externas que podem levar à transmissão da giardíase.

Em relação ao sexo, apesar de não haver relação estatisticamente significante, a maioria das crianças com giardíase eram do sexo masculino, o que corrobora com o estudo de Saad et al. (2012) e Younas et al. (2008). Provavelmente, essa diferença entre os sexos pode ser atribuída às diferenças comportamentais entre meninos e meninas.

Assim como na avaliação para toxocaríase, ter quintal ou não nas residências, não apresentou relação com a infecção por *G. duodenalis* em ambos os grupos estudados. De acordo com Mumtaz et al. (2009), a maioria dos indivíduos parasitados também apresentavam residências cimentadas, assim como neste estudo. Na verdade, a questão não pode se restringir apenas ao fato de o quintal ser cimentado ou não, até porque a maioria das crianças infectadas com *G. duodenalis* possuíam cães ou gatos, conjecturando-se que esses animais defecavam no quintal, contaminando o ambiente. Entretanto, fatores como ter gato e ou cão, local em que o animal reside e defeca, o que na maioria dos casos era na área externa da casa, não estiveram relacionados à infecção. Todos esses animais, de acordo com os donos recebiam a vermifragação, o que pode contribuir também para redução da transmissão da giardíase. Em estudo realizado por Zanzani et al. (2014), *G. duodenalis* e *Toxocara canis*

foram um dos parasitos mais prevalentes encontrados em cães e gatos, ambos com potencial zoonótico (MACPHERSON, 2013; RYAN, CACCIÒ, 2013). Sendo assim, cuidados com animais domésticos, como a vermiculação adequada e os cuidados básicos com assistência de um médico veterinário podem fazer diferença na redução da parasitose. Segundo Zanzani et al. (2014), veterinários têm relevante papel na indicação de condutas corretas para reduzir os riscos de infecção em animais e seres humanos.

Embora a geofagia não tenha ocorrido em nenhuma das crianças positivas para *G. duodenalis*, e a onicofagia tenha ocorrido em alguns casos positivos, ambas as variáveis não foram estatisticamente significantes, pressupondo-se que esses fatores não tenham relação com a parasitose nessa amostra de crianças. Mumtaz et al. (2009) verificaram que o parasito mais comum encontrado em crianças abaixo de cinco anos foi *G. duodenalis* e que a geofagia foi considerada fator de risco. Provavelmente, nesse trabalho citado, a geofagia foi considerada risco devido ao fato das crianças do estudo terem faixa etária menor, diferentemente deste estudo, em que a idade variou entre seis e 15 anos. Pelo fato das crianças terem maior faixa etária, os hábitos tendem também a mudar.

A única variável relacionada estatisticamente entre atopia e giardíase foi o fato das crianças atópicas terem parentes de primeiro grau também com atopia, ou seja, crianças que tinham parentes com alergia respiratória (fator hereditário) apresentaram menor positividade para *G. duodenalis*, a atopia parental foi considerada fator de proteção para o parasito. Apesar de não se saber qual relação pode existir entre esses fatores, Bayraktar et al. (2005) concluiu que a resposta imune Th1 parece predominar em indivíduos infectados com *G. duodenalis*. A incidência de infecções graves, na infância, tem diminuído ao longo dos anos, devido às melhorias na higiene e ao uso de medicamentos. Dessa forma, a falta do contato com essas infecções prejudica o desenvolvimento da resposta Th1 e favorece a resposta Th2 dirigida para alérgenos ambientais, apoioando a hipótese da higiene (COOKSON, MOFFATT, 1997; STRACHAN, 1989; ROOK, STANFORD, 1998; YAZDANBAKHS ET AL, 2001) que, em suma, sugere que indivíduos que são menos expostos ao ambiente, às doenças, têm maior facilidade de desenvolver alergias, ou seja, haveria associação inversa entre o desenvolvimento de doenças de resposta Th1 e atopia. Assim sendo, fazendo-se analogia com o atual trabalho, pode-se observar que realmente houve uma associação inversa entre atopia e giardíase, pois ser atópico e com histórico de hereditariedade foram fator de proteção na aquisição e manutenção da giardíase.

Em relação à sintomatologia, as dores abdominais foram mais frequentes em crianças com giardíase, diferentemente das outras variáveis como náusea, vômitos, perda de peso e diarreia que não foram frequentes nas crianças positivas. Entre os fatores causadores de dor abdominal recorrente, a infecção com *G. duodenalis* é frequente de acordo com Younas et al. (2008). No referido estudo, a principal observação foi a existência concomitante de alta prevalência de dor abdominal com a infecção por *G. duodenalis*, na qual 31% de crianças, com idades entre 4 a 12, com dor abdominal recorrente estavam infectadas com o parasita. Entretanto, diferentemente do atual estudo, náuseas e vômitos ocorreram em 56%, perda de peso em 64% e diarreia em 5,75% das crianças com giardíase. Em pesquisa realizada por Maas et al. (2014), com detecção de protozoários intestinais em crianças com sintomas gastrointestinais, no grupo de crianças que não receberam tratamento, fatores como náuseas, vômitos, diarreia crônica ou aguda e perda de peso não foram estatisticamente significantes. Mellingen et al. (2010) também não encontraram diferença estatística entre crianças positivas e negativas para *G. duodenalis* em relação à sintomatologia gastrointestinal.

Apesar de a maioria das crianças com giardíase não apresentarem manifestações cutâneas, algumas apresentaram urticária tanto no grupo atópicas quanto no grupo não atópicas. Em estudo realizado por Nenoff et al. (2006), em pacientes com urticária crônica ou prurido, o tratamento com metronidazol, por via oral, ou tinidazol foi bem sucedido. De acordo com os autores, as manifestações cutâneas associadas à giardíase ocorrem raramente, sendo a urticária uma alergia secundária à infecção gastrointestinal causada por *G. duodenalis*. De Breucker et al. (2010) também relataram um caso de associação entre giardíase, urticária e sintomas gastrointestinais, os quais desapareceram logo após o tratamento com tinidazol.

Corroborando com este estudo, Souza et al. (2012) também não encontraram associação ou diferença estatisticamente significante entre asma alérgica e ou rinite alérgica e infecção por *G. duodenalis*. Por outro lado, Di Prisco et al. (1998) observaram possível associação entre alergia respiratória crônica e giardíase. Entretanto, os autores consideraram pacientes com infecção concomitante por helmintos e protozoários, o que pode explicar a discordância com os resultados deste trabalho ao se analisar o grupo atópicos. Segundo Souza et al. (2012), o estudo de Di Prisco et al. (1998) analisou pacientes com infecção concomitante, sugerindo que a infecção por *G. duodenalis* pode estar envolvida com aumento dos sintomas concomitantes de asma e rinite, não pela protozoose em si, mas pela helminfase associada.

De acordo com os dados deste trabalho, observamos que a maioria das crianças com giardíase apresentaram valores normais de eosinófilos, o que corrobora com o estudo de Silva et al. (2012) que também não encontraram eosinofilia estatisticamente significativa em pacientes com giardíase ou em pacientes alérgicos.

Em relação aos níveis de IgE, alguns estudos como o de Di Prisco et al. (1993) e Di Prisco et al. (1998) têm verificado altos títulos de IgE específica para proteínas alimentares, como leite e ovos em pacientes com *G. duodenalis*, porém quando a análise é feita para aeroalérgenos como *D. pteronissynus*, observou-se que não houve diferença entre os níveis de IgE específica para Dpt entre os grupos parasitados e não parasitados com *G. duodenalis*, corroborando com os dados apresentados neste trabalho. Assim como ocorreu para *Toxocara* sp., as diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de IgE específica para Dpt, parecem estar relacionada somente à atopia, independentemente dos resultados parasitológicos. Souza et al. (2012) também não verificaram diferença entre os níveis de IgE específica para aeroalérgenos entre crianças positivas e negativas para *G. duodenalis*. De acordo com Soares et al. (2007), os principais alérgenos sensibilizantes determinados pelo teste cutâeno de puntura são os ácaros, com predomínio de Dpt e *Dematophagoides farinae*.

A concordância entre os métodos sorológicos IgA sérica anti*Giardia*, IgA fecal anti*Giardia* e IgG anti*Giardia* tiveram Kappas de valores baixos, denotando reprodutibilidade ruim. Na verdade, a cinética de produção de anticorpos sistêmicos ou locais varia conforme o tempo de infecção e o grau de parasitismo como no estudo realizado por Amorim et al. (2010) em que a IgA fecal foi detectada no início da infecção. Provavelmente a produção de IgA fecal no início da infecção ocorre com a estimulação das placas de Peyer. (CRAIG, CEBRA, 1971; OWEN et al, 1981). Se por um lado a produção de IgA fecal parece começar mais rapidamente do que os anticorpos sistêmicos, por outro, os níveis de IgA fecal parecem cair mais rapidamente como visto no estudo de Amorim et al. (2010). Esse fato poderia explicar a negatividade da IgA fecal observada neste trabalho mesmo quando as amostras eram positivas para os cistos de *G. duodenalis*, diferentemente da IgA sérica que parece manter níveis mais constantes por mais tempo quando comparada a IgA fecal. A IgA fecal é o antícorpo predominante no lúmen intestinal e, possivelmente o mais importante mecanismo de defesa (ROSALES-BORJAS et al, 1998). De acordo com o estudo de Saad et al. (2012), em crianças infectadas com *G. duodenalis*, os níveis de IgG sérica são também altos quando comparados a IgG de saliva, IgA sérica ou IgA de saliva, o que poderia explicar a unanimidade da

positividade da IgG sérica em todos os casos em que houve positividade para cistos de *G. duodenalis*.

Os dados sugerem que a infecção por *G. duodenalis* e *Toxocara* sp. não foi associada com a presença de doenças alérgicas do trato respiratório e alergias cutâneas. A atuação de mecanismos imunes entre alergias e parasitoses pode ser algo sem associação e interação, contudo mais pesquisas envolvendo epidemiologia, variáveis clínicas e laboratoriais devem ser conduzidas para se avaliar esse importante problema de saúde que afeta principalmente crianças.

6 – Conclusão

- ✓ O atual estudo confirmou soroprevalência considerável de *Toxocara* sp. em crianças na região, entretanto sem nenhuma relação estatística com atopia.
- ✓ A maioria dos indivíduos com sorologia positiva para *Toxocara* sp. demonstraram estar em fase crônica da infecção.
- ✓ Não houve associação entre a soroprevalência para *Toxocara* sp. e variáveis clínicas, laboratoriais e sociodemográficas e comportamentais.
- ✓ Os níveis de IgE específica para Der p não se apresentaram maiores nos indivíduos positivos para *G. duodenalis* e sorologicamente positivos para *Toxocara* sp.
- ✓ A única variável de perfil clínico, que se associou estatisticamente com a giardíase foi “parentes com alergia” no grupo atópicas.
- ✓ Nenhuma das variáveis sociodemográficas e comportamentais se associaram com a giardíase em ambos os grupos.
- ✓ A concordância entre IgA sérica anti*Giardia*, IgA fecal anti*Giardia* e IgG sérica anti*Giardia* foi baixa.

7 - Referências Bibliográficas

ABDUL-WAHID, A.; FAUBERT, G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 691-703, 2008.

ADAM, R.D. The biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.

ALCANTARA-NEVES, N. M.; VEIGA, R. V.; DATTOLI, V. C. C.; FIACCONI, R. L.; ESQUIVEL, R.; CRUZ, A. A.; P. J. COOPER, RODRIGUES, L. C. BARRETO, M. L. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, p. 359-367, 2012.

ALDERETE, J. M. S.; JACOB, C. M. A.; PASTORINO, A. C.; ELEFANT, G. R.; CASTRO, A. P. M.; FOMIN, A. B. F.; CHIEFFI, P. P. Prevalence of *Toxocara* Infection in Schoolchildren from the Butantã region, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 593-597, 2003.

AMORIM, R. M. R.; SILVA, D. A. O.; TAKETOMI, E. A.; MORATO, M. G. V. A.; MUNDIM, M. J. S.; RIBEIRO, D. P.; OLIVEIRA, T. C.; VIANA, J. C.; GOMES, M. A.; CURY, M. C. *Giardia duodenalis*: Kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. **Experimental Parasitology**, v.125, n. 3, p. 297-303, 2010.

ANARUMA FILHO, F.; CHIEFFI, P. P.; CORREA, C. R. S.; CAMARGO, E. D.; SILVEIRA, E. P. R.; ARANHA, J. J. Human toxocariasis: incidence among residents in the outskirts of Campinas, state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 293-294, 2003.

ANARUMA FILHO, F.; CHIEFFI, P. P.; CORREA, C. R. S.; CAMARGO, E. D.; SILVEIRA, E. P. R.; ARANHA, J. J. B.; RIBEIRO, M. C. S. A. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p.303-307, 2002.

ARAUJO, M. I.; LOPES, A. A.; MEDEIROS, M.; CRUZ, A. A.; SOUSA-ATTA, L.; SOLÉ, D.; CARVALHO, E. M. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* Infection. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, p. 145-148, 2000.

AZIZ, H.; BECK, C. E.; LUX, M. F.; HUDSON, M. J. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. **Clinical Laboratory Science**, Savannah, v. 14, n. 3, p. 150-154, 2001.

BAYRAKTAR, M. R.; NEHMET, N.; DURMAZ, R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. **Acta Tropica**, v. 95, p. 116-122, 2005.

BAYRAKTAR, M. R.; MEHMET, N.; DURMAZ, R. Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in patients infected with *Giardia lamblia*. **Acta parasitologica Turcica**, v. 29, n.3, p. 160-162, 2005.

BIOESTAT 5.0. Sociedade Civil Mamirauá, Brasil, Belém, Pará, Brasil, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BREUCKER, S.; PEPERSACK, T.; COGAN, E. Chronic urticaria in a middle-aged woman. **Acta Clinica Belgica**, v. 65, n. 3, p. 190-191, 2010.

BUIJS, J.; BORSBOOM, G.; RENTING, M.; HILGERSOM, W.J.A.; van WIERINGEN, J.C.; JANSEN, G.; NEIJENS, J. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. **European Respiratory Journal**, v. 10, p. 1467-1475, 1997.

BUIJS, J.; BORSBOOM, G.; van GEMUND, J. J.; HAZEBROECK, A.; van DONGEN, P. A.; van KNAOPEN, F.; NEIJENS, H. J. *Toxocara* seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. **American Journal of Epidemiology**, v. 140, n. 9, p. 839-847, 1994.

CARVALHO, E. A.; ROCHA, R. L. Toxocariasis: *visceral larva migrans* in children. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 2, p. 100-110, 2011.

CARVALHO, T. B., CARVALHO, L. R., MASCARINI, L. M. Ocurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo state, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermiculares*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 5, n. 48, p. 269-273, 2006.

CASTRO, E. D. R.; GERMINI, M. C. B. Y.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B.; LIMA, I. C. G.; LOBO, P. S.; FRAGA, V. D.; CONCEIÇÃO, L. M.; MACHADO, R. L. D.; ROSSIT, A. R. B. Enteropathogens detected in a daycare center, southeastern brazil: bacteria, virus, and parasite research. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 27-32, 2015.

Center for Disease Control and Prevention. Toxocariasis. Treatment Information. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/toxocariasis/tx.html>. Acesso em 12/04/2015.

CHAN, P. W. K.; ANUAR, A. K.; FONG, M. Y.; DEBRUYNE, J. A.; IBRAHIM, J. *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. **Pediatrics International**, v. 43, n. 4, p. 350-353, 2001.

COOKSON, W.; MOFFATT, M. F. Asthma: na epidemic in the absence of infection? **Science**, v. 275, p. 41–42, 1997.

COOPER, P. J. *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, p. 551-553, 2008.

CRAIG, S. W.; CEBRA, J. J. Peyer's patches: na enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. **The journal of Experimental Medicine**, v. 134, p. 188-193, 1971.

DEAN, A. G. **Epi Info: a database and statistics program for public health professionals. Versão 3.5.1.** Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2008.

DEL PRETE, G. F.; DE CARLI, M.; MASTROMAURO, C.; BIAGIOTTI, R.; MACCHIA, D.; FALAGIANI, P.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2T helper) profile of cytokine production. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 346-350, 1991.

DI PRISCO, M. C.; HAGEL, I.; LYNCH, N. R.; JIMENEZ, J. C.; ROJAS, R.; GIL, M.; MATA, E. Association between giardiasis and allergy. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 81, n. 3, p. 261-265, 1998.

DIAMOND, L. S.; HARLOW, D. P; CUNNICK, C. C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 72, n. 4, p. 431-432, 1978.

DZIEMIAN, E.; ZARNOWSKA, H.; KOLODZIEJ-SOBOCINSKA, M.; MACHNICKA, B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 30, p. 187-190, 2008.

ECKMAM, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 25, p. 259-270, 2003.

ELEFANT, G. R.; SHIMIZU, S. H.; SANCHEZ, M. C. A.; JACOB, C. M. A.; FERREIRA, A. W. A Serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, n. 4, p. 164-172, 2006.

Epi info. Version 3.5.4. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2012. Disponível em <<http://www.cdc.gov/epiinfo>>. Acesso em 23/10/2013.

FALLON, P.; MANGAN, N. Suppression of Th2-type allergic reactions by helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 220-230, 2007.

FARTHING, M. J. Giardiasis. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 25, n. 3, p. 493–515, 1996.

FAUST, E. C; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoan and helminths in feces. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 25, n. 3, p. 241-262, 1939.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 126, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

FERNANDO, D.; WICKRAMASINGHE, P.; KAPILANANDA, G.; DEWASURENDRA, R. L.; AMARASOORIYA, M.; DAYARATNE, A. *Toxocara* seropositivity in Sri Lankan children with asthma. **Pediatrics International**, v. 51, p. 241-245, 2009.

FERREIRA, C. B.; MARÇAL JÚNIOR, O. Enteroparasitoses em escolares do município de Martinésia, Uberlândia, MG: Um estudo piloto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 5, p. 373-377, 1997.

FIGUEIREDO, S. D. P.; TADDEI, J. A. A. C.; MENEZES, J. J. C.; NOVO, N. F.; SILVA, E. O. M.; CRISTÓVÃO, H. L. G.; CURY, M. C. F. S. Clinical-epidemiological study of toxocariasis in a pediatric population. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 126-132, 2005.

FONSECA, J. E.; CARNEIRO, M. A.; PENA, J. L.; COLOSIMO, E. A.; SILVA, N. B.; COSTA, A. G. F. C.; MOREIRA, L. E.; CAIRNCROSS, S.; HELLER, L. Reducing occurrence of Giardia duodenalis in children living in semiarid regions: impact of a large scale rainwater harvesting initiative. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2943, 2014.

GARCIA, L. S. **Diagnostic Medical Parasitology**, forth Ed. ASM Press, Washington, PP. 309-312, 2001.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; ANTONICELLI, L.; D'AMATO, G.; SILVESTRI, C.; DEL PRETE, M. S.; SCALISE, G. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 490-492, 2003.

GLICKMAN, L. T.; CYPESS, R. H. *Toxocara* infection in animal hospital employees. American Journal of Public Health, v. 67, p.1193-1195, 1977.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M. Epidemiology and pathogenesis os zoonotic toxocariasis. Epidemiolo Reviews, v. 3, p.230-250, 1981.

GOKA, A. K. J.; ROLSTON, D. D. K.; MATHAN, V. I.; FARTHING, M. J. G. The relative merits of fecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 84, n. 1, p. 66-67, 1990.

GONZALES-QUINTELA, A.; GUDE, F.; CAMPOS, J.; GAREA, M. T.; ROMERO, P. A.; REY, L.; MEIJIDE, L. M.; FERNANDEZ-MERINO, M. C.; VIDAL, C. *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 139, p. 317-324, 2006.

GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA,
Disponível em: www.graphpad.com.

HARDIN, J. A.; BURET, A. G.; OLSON, M. E.; KIMM, M. H.; GALL, D. G. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 908-912, 1997.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SEPPAIA, I., MAKELA, O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 736-740, 1989.

HEDMAN, K.; ROUSSEAU, S.A. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **Journal of Medical Virology**, v. 27, n. 4, p. 288-292, 1989.

HENRY, John Bernard. Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais, - 18^a ed. - Editora Manole, 1995.

HEYMANS, H. S. A.; ARONSON, D. C.; van HOOFT, M. A. J. Giardiasis in childhood: an unnecessarily expensive diagnosis. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 146, n. 4, p. 401-403, 1987.

HEYWORTH, M. F. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. **Infection and Immunity**, Washington, v. 52, n.2, p. 568-571, 1986.

HEYWORTH, M. F. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 78, n. 1, p. 73-76, 1992.

HEYWORTH, M. F. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 78, n. 1, p. 73-76, 1992.

HUBNER, J.; UHLIKOVA, M.; LEISSOVA, M. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. **Epidemiology Microbiology Immunology**, v.50, p. 67-70, 2001.

HUBNER, J.; UHLIKOVA, M.; LEISSOVA, M. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. **Epidemiology Microbiology Immunology**, v. 50, n. 2, p. 67-70, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo populacional Uberlândia 2010. Disponível em<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> Acesso em 15/01/2015.

JACOBS, D. E.; WOODRUFF, A. W.; SHAH, A. L.; PROLE, J. H. *Toxocara* Infections and Kennel workers. **British Medical Journal**, v.1, p. 1: (6052) 51, 1977.

JIMENEZ, J. C.; FONTAINE, J.; GRZYCH, J. M.; DEI-CAS, E.; CAPRON, M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 152-160, 2004.

KANAMURA, H. Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; SILVA, L. C. Solubilization of antigen *S. mansoni* adult worms for the passive hemagglutination test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 23, n. 2, p. 92-95, 1981.

KANCELJAK-MACAN, B.; MACAN, J.; PLAVEC, D.; KLEPAC, T.; MILKOVIC-KRAUS, S. The 3 mm skin prick test (SPT) threshold criterion is not reliable for *Tyrophagus putrescentiae*: the re-evaluation of SPT criterion to dust mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 12, p. 1187-1190, 2002.

KEISTER, D. B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 77, n. 4, p. 487-488, 1983.

KUK, S.; OZEL, E.; OGUZTURK, H.; KIRKIL, G.; KAPLAN, M. Seroprevalence of *Toxocara* antibodies in patients with adult asthma. **Southern Medical Journal**, v. 99, p. 719-722, 2006.

KUSTIMUR, S.; DOGRUMAN AL, F.; OGUZULGEN, K.; BAKIR, H.; MARAL, I.; TURKTAS, H.; TUZUN, H. *Toxocara* seroprevalence in adults with bronchial asthma. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 270-274, 2007.

LANGFORD, T. D.; HOUSLEY, M. P.; BOES, M.; CHEN, J.; KAGNOFF, M. F.; GILLIN, F. D.; ECKMANN, L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 1, p. 11-18, 2002.

LEBWOHL, B.; DECKELBAUM, R. J.; GREEN, P. H.; Giardiasis. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 57, n. 7, p. 906-913, 2003.

LI, E.; ZHOU, P.; PETRIN, Z.; SINGER, S. M. Mast cell-dependent control of Giardia lamblia infectious in mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6642-6649, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGHT, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LYNCH, N. R.; HAGEL, I.; VARGAS, V.; ROTUNDA, A.; VARELA, M. C.; DI PRISCO, M. C.; HODGEN, A. N. Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. **Parasitology Research**, v. 79, n. 7, p. 547-50, 1993.

MAAS, L.; DORIGO-ZETSMA, J. W.; GROOT, C. J.; BOUTER, S.; PLOTZ, F. B.; VAN EWIJK, B. E. Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. **Clinical Microbiological and Infection**, v. 20, p. 545-550, 2014.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 999–1008, 2013.

MAGNAVAL, J.F.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B.; Highlights of human toxocariasis .**Korean Journal of Parasitology**, 39, n. 1, p. 1-11, 2001.

MATTIA, S.; COLLI, C. M.; ADAMI, C. M.; GUILHERME, L.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; MARCHIORO, A. A.; GOMES, M. L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **Journal of Helminthology**, v.86, 440-445, 2012.

MELLINGEN, K. M.; MIDTUN, A.; HANEVIK, K.; EIDE, G. E.; SOBSTAD, O.; LANGELAND, N. Post epidemic giardiasis and gastrointestinal symptoms among preschool

children in Bergen, Norway. A cross-sectional study. **Biomed Central Public Health**, v.10, p. 1-8, 2010.

MENDONÇA, L. R.; VEIGA, R. V.; DATTOLE, V. C. C.; FIGUEIREDO, A.; FIACCONE, R.; SANTOS, J.; CRUZ, A. A.; RODRIGUES, L. C.; COOPER, P. J.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; BARRETO, M. L.; ALCANTARA-NEVES, N. M. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban latin American. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n.11, p. e1886, 2012.

MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; GILLIN, F. D.; et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1921-1926, 2007.

MUMTAZ, S.; SIDDIQUI, H.; ASHFAQ, T. Frequency and risk factors for intestinal parasitic infection in children under five years age at a tertiary care hospital in Karachi. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 59, n. 4, p. 216-219, 2009.

MUÑOZ-GUZMÁN, M. A.; DEL RIO-NAVARRO, B. E.; VALDIVIA-ANDA, G.; ALBA-HURTADO, F. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. **Allergologia et Immunopathologia** (Madr), v. 38, p.155-121, 2010.

NENOFF, P.; DOMULA, E.; WILLING, U.; HERRMANN, J. *Giardia lamblia*: Ursache von urtikaria und pruritus oder zufällige assoziation? **Hautarzt**, v. 57, p. 518-522, 2006.

OVERGAAUW, P. A. M. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocariosis in dogs and cats. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, p. 233-251, 1997.

OWEN, R. L.; ALLEN, C. L.; STEVENS, D. P. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in the Peyer's patch epithelium in mice. **Infection and Immunity**, v. 33, p. 591-601, 1981.

OWNBY, D. Allergy testing: in vivo versus in vitro. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 995-1009, 1988.

PARK, H. Y.; LEE, S. U.; HUH, S.; KONG, Y.; MAGNAVAL, J. F. A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 113-117, 2002.

PEREZ, O.; LASTRE, M. B.; DÍAZ, M.; DOMENECH, I.; FAGUNDO, R.; TORRES, D.; FINLAY, C.; CAMPA, C.; SIERRA, G. Evaluation of the immune response in symptomatic and asymptomatic human giardiasis. **Archives of medical research**, v. 25, n.2, p. 171-177, 1994.

PINELLI, E.; BRANDES, S.; DORMANS, J.; GREMMER, E.; van LOREVEN, H. Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v.38, p. 649-658, 2007.

PINELLI, E.; DORMANS, J.; van DIE, I. *Toxocara* and asthma. In: Holland C., Smith H, eds. **Toxocara: the enigmatic parasite**. Oxfordshire, UK: CABI Publishers, p. 42-57, 2006.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, p. 321-333, 2010.

ROLDÁN, W. H.; CAVERO, Y. A.; ESPINOZA, Y. A.; JIMENEZ, S.; GUTIÉRREZ, C. A. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the amazonian city of Yurimaguas, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, p.37-42, 2010.

ROOK, G.A.W.; STANFORD, J. L. Give us this day our daily germs. **Immunology Today**, v. 19, p. 113–116, 1998.

ROSALES-BORJAS, D. M.; DAZ-RIVADENEYRA, J.; DONA-LEYVA, A.; ZAMBRANO-VILLA, S. A.; MASCARÓ, C.; OSUNA, A.; ORTIZ-ORTIZ, L. Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. **Infection and Immunity**, v. 6, p. 756-759, 1998.

ROSE, J. B.; HAAS, C. N.; REGLI, S. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. **American Journal of Public Health**, v. 81, n. 6, p. 709-713, 1991.

ROSNER, B. The Kappa Statistic, In ROSNER, B. **Fundamental of Biostatistics**. 7^a Ed. Boston: Brooks/ Cole Cengage Learning, 2011. Cap. 10, p. 408.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International Journal For Parasitology**, v. 43, p. 943–956, 2013.

SAAD, M. N.; EL-GEBALY.; HALAWA, E. F.; MOUSSA, H. M. E.; RABIA, I.; ABU-ZEKRY, M. Saliva and sérum IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. **Parasitology Research**, v.111, p. 571-575, 2012.

SANTOS, C. K. S.; GRAMA, D. F.; LIMONGI, J. E.; COSTA, F. C.; COUTO, SOARES, R. M.; MUNDIM, M. J. S.; CURY, M. C. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 473–479, 2012.

SAVIGNY, D. H. “In Vitro” maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**, v. 61, n.4, p. 781-782, 1975.

SAVIGNY, D. H.; VOLLER, A.; WOODDRUFF, A. W. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, n. 3, p. 284-288, 1979.

SHARGHI, N.; SCHANTZ, P. M.; CARAMICO, L.; BALLAS, K.; TEAGUE, B. A.; HOTEZ, P. J. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 111-116, 2001.

SILVA, C. C. V.; FERRAZ, R. R. N.; FORNARI, J. V.; BARNABEI, A. S. Epidemiological analysis of eosinophilia and elevation of immunoglobulin E as a predictable and relative risk of enteroparasitosis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 64, n. 1, p. 22-26, 2012.

SKEA, D. L.; UNDERDOWN, B. J. Acquired resistance to *Giardia muris* in X-linked immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 5, p. 1733-1738, 1991.

SNIDER, D. P.; SKEA, D.; UNDERDOWN, B. J. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the xid gene. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 11, p. 2338-2342, 1988.

SNIDER, D. P.; UNDERDOWN, B. J. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 52, p. 271-278, 1986.

SOARES, F. A. A.; SEGUNDO, G. R. S.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Revista da Associação Médica Brasiliense**, v. 53, n.1, 2007.

SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; SINGER, S. M. *Giardia duodenalis*: The double-edged sword of immune responses in giardiasis. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 292-297, 2010.

SOUZA, V. M. O.; SALES, I.R.F.; PEIXOTO, D. M.; COSTA, V. M. A.; RIZZO, J. A.; SILVA, A.R.; CAMILO, R. F.; PIEROTTI, F.F.; SOLÉ, D.; SARINHO, E. S. C. Giardia lamblia and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a hight incidence of protozoan infections. **Jornal de Pediatria**, v.88, p.233-238, 2012.

STIBBS, H. H.; SAMADPOUR, M.; MANNING, J. F. Enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia*cyst antigens in formalin- fixed and unfixed human stool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 25, p. 1665-1669, 1988.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene and household size. **British Medical Journal**. v. 299, p. 1259–1260, 1989.

TAYLOR, M. R. H.; HOLLAND, C. V. Toxocariasis, in: Gillespie, S.H.; Pearson, R.D. (Eds.), **Principles and Practice of Clinical Parasitology**. John Wiley, London, pp. 501-520, 2001.

TEIXEIRA, C. R.; CHIEFFI, P. P.; LESCANO, S. A. Z.; SILVA, E. O. M.; FUX, B.; CURY, M. C. Frequency and risk factors for toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n.5 p. 251-255, 2006.

TEIXEIRA, J. C.; HELLER, L.; BARRETO, M. L. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, p. 1489-1493, 2007.

UNGAR, B.L.P.; YOLKEN, R.H.; NASH, T.E.; QUINN, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 149, n.1, p. 90-97, 1984.

Von MUTIUS, E.; WEILAND, S. K.; FRITZSCH, C.; DUHME, H.; KEIL, U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. **Lancet**, v. 351, p. 862-866, 1998.

WOLFFE, M. S. Giardiasis (Review). **Microbiological Reviews**, Washington, v. 5, p. 93-100, 1992.

YANKE, S. J.; CERI, H.; MCALLISTER, T. A.; MORCK, D. W.; OLSON, M. E. Serum immune response to *Giardia duodenalis* in infected lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 9-19, 1998.

YAZDANBAKSH, M.; VAN DEN BIGGELAAR, A.; MAIZELS, R. M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 7, p. 372-377, 2001.

YUNAS, M.; SHAH, S.; TALAAT, A. Frequency of giardia lamblia infection in children with recurrent abdominal pain. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 58, n. 4, p. 171-174, 2008.

ZANZANI, S. A.; GAZZONIS, A. L.; SCARPA, P.; BERRILLI, F.; MANFREDI, M. T. Intestinal Parasites of Owned Dogs and Cats from Metropolitan and Micropolitan Areas: Prevalence, Zoonotic Risks, and Pet Owner Awareness in Northern Italy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

8 - Anexos

8.1- Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Humana



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail:cpq-imt@usp.br



São Paulo, 1º de dezembro de 2010.

Ilmo (a) Sr (a)
Dra. Marcia Cristina Cury
(aos cuidados de Rúbia Mara Rodrigues Amorim)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, tomou ciência da execução do projeto classificado sob número **CPE-IMT 2010/086** e intitulado “Interação e associação dos fatores de risco entre *Toxocara sp.* e *Giardia duodenalis* e alergia em crianças atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU)”, sob sua responsabilidade, no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Atenciosamente

Dr. Paulo Cotrim

Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 316/10 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
083/10

Projeto Pesquisa: Interação e associação dos fatores de risco entre toxocara sp. e giargia duodenalis e alergia em crianças atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

Pesquisador Responsável: Márcia Cristina Cury

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do relatório parcial: junho de 2011.

Data de entrega do relatório final: Dezembro de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 11 de junho de 2010.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O (a) seu (sua) filho (a) está sendo convidado a participar como voluntário da pesquisa intitulada **“Interação e associação dos fatores de risco entre *Toxocara* sp. e *Giardia duodenalis* e alergia em crianças atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG), Uberlândia-MG”** O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que será realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se o (a) senhor (a) não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo ao senhor (a). Se o (a) senhor (a) concordar em participar, basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se o (a) senhor (a) tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa.

Obrigado (a).

Objetivo do estudo:

O projeto foi proposto porque há pouco conhecimento nacional sobre a associação entre alergia e infecções por parasitos. O objetivo desse trabalho é estudar, em crianças atendidas no Ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica, no município de Uberlândia, a associação de manifestações alérgicas com infecções causadas por *Toxocara* sp. E *Giardia duodenalis*. Neste estudo, conheceremos os fatores que facilitam a infecção por parasitos, utilizando questionários que serão aplicados aos participantes da pesquisa.

Procedimentos:

Para a realização desse estudo, serão coletadas amostras de sangue e confeccionados testes cutâneos que serão realizados somente pelo pediatra responsável. Também serão obtidas amostras fecais, colhidas pelos pais ou responsáveis pelas crianças. O inconveniente aos quais os pacientes serão submetidos será na coleta de sangue e no momento da puntura do teste cutâneo. O material colhido será devidamente enumerado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos à paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamento de quaisquer espécie.

Em nenhum momento o nome da paciente será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

O paciente não terá nenhum ônus ou ganho financeiro por participar da pesquisa. Não haverá qualquer tipo de despesa ao participante, no que tange a materiais e exame.

Pesquisadores:

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Coordenação do projeto sob a responsabilidade da Profª. Drª. Márcia Cristina Cury do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU; Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo, médico pediatra e alergologista, responsável pela coleta de sangue e teste cutâneo; Mestre Daliane Faria Grama, responsável pela execução e análise dos exames de sorologia e aplicação dos questionários; Prof. Dr Ernesto Taketomi e Dra Deise A. O. Silva responsáveis pelo laboratório de Imunologia da UFU; Dra Fabiana de Paula Martins e Profa Dra. Maria Aparecida Gomes responsáveis pela produção do antígeno.

Confidencialidade:

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante receberão um código e não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. Caso o (a) senhor (a) queira poderá ter acesso aos resultados individuais. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Benefícios e Riscos:

Esta pesquisa não oferece qualquer risco ao participante, uma vez que a coleta e o teste serão realizados por médico experiente. Por outro lado, a sua autorização em participar deste projeto, estará colaborando para um melhor entendimento da possível relação alergia e parasitos, possibilitando futuras medidas de conduta clínica e tratamentos eficazes.

O (A) senhor (a) é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo e ao assinar esse termo de consentimento, não está abrindo mão de seus direitos legais.

Através deste documento fica assegurado o direito do (a) Sr. (a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados em quaisquer momentos antes e durante a pesquisa. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reservo-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o (a) senhor (a) e uma cópia com o pesquisador.

Qualquer dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações a respeito da pesquisa, antes e durante o curso da mesma, a senhora poderá entrar em contato com: Daliane Faria Grama ou Profª. Dr. Márcia Cristina Cury na Av. Pará 1720 Bloco 4C-Campus Umuarama- CEP: 38400-902- Uberlândia MG, Telefone: (34) 32182198, ou no (34) 32383263. Outras informações poderão ser esclarecidas pelo Conselho de Ética-CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila nº 2121, Bloco J, Bairro Santa Mônica, Uberlândia MG, fone (34)3239-4131.

Uberlândia, _____ de _____ de 2010

Eu, _____, pai ou responsável pelo paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, para participar do projeto acima, após ser devidamente esclarecido, para que façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do pai ou responsável

Assinatura do pesquisador responsável

Questionário clínico e sócioepidemiológico

Dados da criança pesquisada – informações individuais e domiciliares

I - Identificação

1 – Número de identificação da criança _____

2 – Nome da criança _____

3 – Data de nascimento _____/_____/_____

4 – Idade (anos) _____

5 – Sexo ()M ()F

6 – Cidade _____

7 – Bairro _____

8 – Data da entrevista _____/_____/_____

Perfil Clínico e Sócioepidemiológico da população estudada – informações individuais e domiciliares

1 - Número do questionário _____

2 - Número de identificação da criança pesquisada _____

3 - Tipo de manifestação alérgica:

4 - Atopia () Sim () Não

Teste cutâneo:

5 - Residência () Apartamento
 () Casa sem quintal
 () Casa com quintal

Observações:-

6 - Criança possui cão ou gato em casa () Sim () Não

7 - Local que o animal reside () Fora da residência
 () Dentro da residência

8 - Local que o animal defeca () Em areia especial ou banheiro dentro da residência
 () Fora da residência

9 - O animal é vermifugado () Sim () Não

10 - A criança possui hábito de geofagia () Sim () Não

11 - A criança possui hábito de onicofagia () Sim () Não

12 - A criança freqüenta caixa de areia de parques, praça pública, escola () Sim () Não

13 - Parentes com asma () Sim () Não

14- Exposição a fumantes em casa () Sim () Não

Variáveis Clínicas

15 – Tosse Crônica () Sim () Não

16 - Pneumonia () Sim () Não

17 - Manifestações cutâneas () Sim () Não

18 – Rinite () Sim () Não

19 - Hepatomegalia () Sim () Não

20 - Esplenomegalia () Sim () Não

21 - Dor abdominal () Sim () Não

22 - Náusea () Sim () Não

23 - Vômito () Sim () Não

24 - Perda de peso () Sim () Não

25 – Diarreia () Sim () Não

Outras observações clínicas avaliadas pelos

médicos: _____



Seroprevalence of *Toxocara* spp. in children with atopy

Daliane Faria Gramá^a, Susana Zevallos Lescano^b, Kelem Cristina Pereira Mota^a, Brunna dos Anjos Pultz^a, Juliana Silva Miranda^a, Gesmar Rodrigues Silva Segundo^c, Ernesto Akio Taketomi^d, Karla Pereira Fernandes^c, Jean Ezequiel Limongi^a, Fabiana Martins de Paula^e, Pedro Paulo Chieffi^b and Márcia Cristina Cury^{a,*}

^aInstituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; ^bInstituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP), Laboratório de Helmintologia, São Paulo, Brazil; ^cPediatric allergist, Ambulatório de Pediatria, Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; ^dInstituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; ^eDepartamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Tel: +55 34 3218 2333; E-mail: cury@umuarama.ufu.br

Received 26 April 2014; revised 15 September 2014; accepted 17 September 2014

Background: Epidemiological studies around the world suggest that infection with *Toxocara* spp. can contribute to the development or worsening of atopic diseases, especially in children. This study investigated the seroprevalence of toxocariasis in atopic children treated at the pediatric clinic of the Federal University of Uberlândia Clinical Hospital, identifying possible relationships with risk factors.

Methods: The study was conducted between November 2011 and March 2013. Blood samples were collected from 173 children aged 6 to 15 years, who were first subjected to clinical exams and then to a skin-prick test to determine the presence or absence of atopy. Risk factors for toxocariasis were analyzed based on a questionnaire. Serum samples were tested for the presence of IgG antibodies to *Toxocara* spp. by means of enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: The seroprevalence of *Toxocara* spp. was 19.6% (24/122) in atopic children and 15% (8/51) in non-atopic children, with no statistical difference. No significant association was found between infection and possible risk factors in atopic and non-atopic children.

Conclusions: Although no statistical association was found between human toxocariasis and atopy, this study revealed a high seroprevalence of *Toxocara* spp. in children that may indicate environmental contamination with the parasite's eggs in the area where these children live.

Keywords: Atopic children, ELISA, Seroprevalence, Toxocariasis

Introduction

Toxocariasis is a zoonosis caused by the roundworm *Toxocara canis* that infects dogs or the roundworm *Toxocara cati*, which infects cats. In children, infection occurs by the ingestion of *Toxocara* spp. eggs through hand contamination, soil ingestion, direct contact with puppies and kittens, and with objects contaminated with infective eggs of these parasites.¹ When infective eggs and larvae are ingested by humans, who are incompatible hosts, they become free in the intestine and pass through the intestinal wall without developing into the adult form. Three clinical forms of toxocariasis are described: visceral larva migrans (VLM), ocular larva migrans (OLM) and subclinical or covert toxocariasis.^{2–5}

Despite the high prevalence of toxocariasis, even in industrialized countries, it is often overlooked because it is difficult to diagnose.⁶ The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the

method used for diagnostics and for epidemiological studies on the detection of IgG, the immunoglobulin which is reactive to *Toxocara* excretory-secretory antigens. The sensitivity and specificity of this method varies according to the antigen used.^{2,4}

Toxocariasis infection occurs worldwide and seroprevalence studies have shown that it is one of the most common zoonotic infections,⁷ varying according to the region under study. A study conducted in France detected 92.8% seroprevalence,⁸ while another in Denmark found a seroprevalence of 2.4%.⁹ In Latin America, a survey conducted in Peru detected a seroprevalence of 35.6%,¹⁰ while a survey of children in Brazil found a seroprevalence of 47% in Bahia,¹¹ 54.8% in São Paulo⁵ and 8.7% in Minas Gerais.¹²

The seroprevalence of *Toxocara* spp. has been widely investigated in the etiology of asthma, especially in children as they are often exposed to infection by these helminths in playgrounds,

parks and sandboxes, as well as to other potential associated risk factors.^{13–15} A study to evaluate the relationship between seroprevalence and allergic asthma in 4- to 6-year-old children found significant results associated with seropositivity for *Toxocara* spp.¹⁶ Epidemiological evidence from studies in several countries has shown that allergic reactions often occur in *Toxocara*-seropositive individuals, suggesting that infection with this helminth contributes to the development of allergic reactions.^{13–15,17}

The purpose of this study was to determine the seroprevalence of *Toxocara* spp. in atopic children and to evaluate possible risk factors associated with the infection.

Materials and methods

Study area and population

The study was conducted between November 2011 and March 2013 and included 122 children aged 6–15 years suffering from allergic disorders and 51 non-allergic children who were treated at the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Federal University of Uberlândia Clinical Hospital (HC-UFG) in Minas Gerais, Brazil (latitude: 18°55'25"S and longitude: 48°16'38"W). The patients came from five neighborhoods in the city of Uberlândia. All children treated at the allergy outpatient clinic during the period of this study were invited to participate with the consent of parents and/or guardians.

The project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia and by the Research Ethics Committee of the São Paulo Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo (USP). All the participants read, understood and signed an informed consent form.

Characterization of the atopy

After each child with clinical symptoms of allergy was examined by the pediatrician and underwent a general clinical examination, the skin prick test was applied to determine the presence of atopy.¹⁸ The skin test was measured for the following allergens: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), *Dermatophagoides farinae* (Der f), *Blomia tropicalis* (Blo t), *Canis familiaris* (Can f), *Felis domesticus* (Fel d), *Blattella germanica* (Bla g), fungi mix and grass mix, a positive control with histamine and a negative control with saline (Stallergenes S.A., Antony, France). The children participating in the study were characterized as atopic if they had a positive reaction with a wheal ≥ 3 mm compared to the negative control. Children presenting no skin reaction or a skin reaction with a wheal smaller than 3 mm were characterized as non-atopic.

Blood and stool sampling

Blood samples (5 ml) were drawn from each child by venipuncture in the forearm, using tubes with and without anti-coagulant EDTA. Samples without anti-coagulant were centrifuged at 700 g for 10 minutes and the resulting sera were aliquoted and stored at -20°C until use in the serological tests. Samples with anti-coagulant were sent to the Federal University of Uberlândia Clinical Analysis Laboratory for a complete blood count in order to check for eosinophilia. Three stool samples were collected

from each patient and examined for other parasites, such as *Ascaris lumbricoides*, in order to eliminate possible cross-reactions and to diagnose concomitant infections. These three samples were collected on alternate days. To protect the child's identity, the blood and stool samples and the questionnaires were identified by serial numbers.

Detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies specific to *Toxocara* spp.

The IgG anti-*Toxocara* spp. antibodies were detected by ELISA, based on a previously described method,¹⁹ with some modifications.²⁰ The antigen solution (made in vitro from L₂ second instar larvae²¹) was used to sensitize microtiter plates (Costar, Corning Incorporated, New York, NY, USA) at a concentration of 1.9 mg/ml in 0.1 M of carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6). IgG antibody blocking was performed with PBS/Tween 20-gelatin 0.05% for 1 hour at 37°C . The plates were washed three times with PBS/Tween 0.05% for 5 minutes. The sera were pre-absorbed with *Ascaris suum* adult worm extract (25 mg/ml) in PBS/Tween for 30 minutes at 37°C . The sera samples were diluted 1/160 and incubated for 1 hour at 37°C . The plates were then washed three times with PBS/Tween 0.05% for 5 minutes. Peroxidase conjugates and anti-human IgG (Sigma Aldrich, San Diego, CA, USA) were diluted 1:10 000 and incubated for 1 hour at 37°C . Ortho-phenylenediamine (0.4 mg/ml, SIGMAFAST-OPD, Sigma Aldrich, San Diego, CA, USA) and H₂O₂-urea (0.4 mg/ml) in 0.05 M citrate buffer were added as a chromogenic substrate. The reaction was stopped with 2 M H₂SO₄. The absorbance at 492 nm was read in a microplate reader. The cut-off values were calculated based on the mean absorbance of sera from seronegative patients with three times the standard deviation.

Socio-epidemiological survey

To collect data for the epidemiological profile, the patients' parents or guardians were asked to fill out a questionnaire, which included information on age, sex, place of birth, contact with animals, basic animal care (where the animal lives, defecates and deworming details), type of home (with or without a yard), behavioral habits such as geophagy, onychophagy, whether the child plays in sandboxes in parks, as well as clinical symptoms suggestive of toxocariasis (eosinophilia, abdominal pain, chronic cough, pneumonia, cutaneous symptoms) and allergic manifestations (rhinitis, asthma).

Statistical analysis

The χ^2 test and Fisher's exact test were applied to compare proportions, using the Epi Info 3.5.1 software (CDC, Atlanta, Georgia, USA). The odds ratio with a 95% confidence interval was used to quantify the association between potential risk factors for infection, using the Epi Info 3.5.1 software package, in which the information was stored and analyzed. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Results

Of the 122 atopic children studied, 24 (19.7%; 24/122) were seropositive for *Toxocara* spp. as diagnosed by ELISA. The average age

for seropositive children was 9.75 ± 2.43 years. Boys (58.3%; 14/24) showed higher positivity than girls. Most of the positive children (87.5%; 21/24) lived in houses with front and/or back yards. Sixty-six percent (16/24) of the positive and atopic children had pets at home. Among these, 81.2% (13/16) had dogs, 12.5% (2/16) had dogs and cats, and 6.3% (1/16) had only cats. Sixty-nine percent (11/16) of these animals lived outside the house, and all the animals (16/16) defecated outside the house. Eighty-one percent (13/16) of the animals of seropositive children were dewormed. As for the behavioral habits of seropositive children, 92% (22/24) were not geophagist, but 54% (13/24) of the seropositive children were found to be onychophagists. Sixty-six percent (16/24) of the seropositive atopic children ($n=16$) were reported to habitually play in sandboxes in parks, public plazas and schools (Table 1). With regard to possible hereditary factors linked to allergic reactions in atopic children, 82% (100/122) of these children had

family members with some type of allergy. Among the children seropositive for *Toxocara* spp., 79% (19/24) had family members with allergies. As for clinical variables in seropositive children, 38% (9/24) suffered from chronic cough, 29% (7/24) had pneumonia, 33% (8/24) had cutaneous symptoms such as hives (urticaria), 71% (17/24) had allergic rhinitis, and 29% (7/24) had allergic asthma. The laboratory tests revealed that 50% (12/24) of the individuals with seroreactivity to *Toxocara* spp. suffered from eosinophilia, with a mean absolute value of 663.09 ± 586.15 (limit up to 500 mm^3) and a mean relative value (%) of 9.15 ± 6.15 . None of the atopic children seropositive for toxocariasis presented stools positive for other intestinal parasites or clinical signs of hepatomegaly or splenomegaly. None of the aforementioned variables were found to be associated with the infection (Table 2).

Eight (16%; 8/51) of the 51 non-atopic children analyzed were seropositive for *Toxocara* spp. diagnosed by ELISA. None of the

Table 1. Socio-demographic and behavioral profile of atopic children ($n=122$) seropositive and negative for *Toxocara* spp. surveyed (Nov 2011 to Mar 2013) at the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Federal University of Uberlândia Clinical Hospital

Variables	Number	Frequency	Positive		Negative		OR (CI 95%) ^a	p-value	Statistical test
			n	%	n	%			
Age		9.05 (2.56) ^a			9.75 (2.43) ^a		8.88 (2.57) ^a		NS
Sex									ANOVA
Female	44	36.1	10	22.7	34	77.3	0.74 (0.27–2.09)	NS	χ^2
Male	78	63.9	14	17.9	64	82.1			
House									
With a yard	111	91	21	18.9	90	81.1	1.60 (0.25–7.42)	NS	Fisher's exact test
Without a yard	11	9	3	27.3	8	72.7			
Owns a cat or dog									
Yes	66	54.1	16	24.2	50	75.8	1.91 (0.69–5.65)	NS	χ^2
No	56	45.9	8	14.3	48	85.7			
The animal lives									
Outside the house	54	81.8	11	20.4	43	79.6	0.36 (0.08–1.74)	NS	Fisher's exact test
Inside the house	12	18.2	5	41.7	7	58.3			
The animal defecates									
Outside the house	65	98.5	16	24.6	49	75.4	Undefined	NS	Fisher's exact test
Inside the house	1	1.5	0	0	1	100			
Animal dewormed									
Yes	57	86.4	13	22.8	44	77.2	0.59 (0.10–4.18)	NS	Fisher's exact test
No	9	13.6	3	33.3	6	66.7			
Geophagist									
Yes	5	4.1	2	40	3	60	2.84 (0.22–26.4)	NS	Fisher's exact test
No	117	95.9	22	18.8	95	81.2			
Onychophagist									
Yes	66	54.1	13	19.7	53	80.3	1.0 (0.37–2.74)	NS	χ^2
No	56	45.9	11	19.6	45	80.4			
Frequency in sandboxes in parks, squares and schools									
Yes	81	66.4	16	19.8	65	80.2	1.0 (0.36–3.03)	NS	χ^2
No	41	33.6	8	19.5	33	80.5			

NS: not significant.

^a Mean and standard deviation.

Table 2. Clinical and laboratory profile of atopic children (n=122) seropositive and negative for *Toxocara* spp. surveyed (Nov 2011 to Mar 2013) at the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Federal University of Uberlândia Clinical Hospital

Variables	Number	Frequency	Positive		Negative		OR (CI 95%)	p-value	Statistical test
			n	%	n	%			
Relatives with allergies									
Yes	100	82	19	19	81	81	0.79 (0.24–3.11)	NS	Fisher's Exact Test
No	22	18	5	22.7	17	77.3			
Abdominal pain									
Yes	56	45.9	12	21.4	44	78.6	1.22 (0.45–3.31)	NS	χ^2
No	66	54.1	12	18.2	54	81.8			
Chronic cough									
Yes	35	28.7	9	25.7	26	74.3	1.65 (0.56–4.63)	NS	χ^2
No	87	71.3	15	17.2	72	82.8			
Pneumonia									
Yes	42	34.4	7	16.7	35	83.3	0.74 (0.23–2.11)	NS	χ^2
No	80	65.6	17	21.3	63	78.7			
Cutaneous symptoms									
Yes	51	41.8	8	15.7	43	84.3	0.64 (0.21–1.76)	NS	χ^2
No	71	58.2	16	22.5	55	77.5			
Respiratory allergy (rhinitis)									
Yes	98	80.3	17	17.3	81	82.7	0.51 (0.16–1.69)	NS	Fisher's exact test
No	24	19.7	7	29.2	17	70.8			
Respiratory allergy (asthma)									
Yes	37	30.3	7	18.9	30	81.1	0.93 (0.29–0.68)	NS	χ^2
No	85	69.7	17	20	69	80			
Eosinophilia									
Yes	37	38.5	12	25.5	35	74.5	1.79 (0.65–4.88)	NS	χ^2
No	75	61.5	12	16	63	84			
Absolute value of eosinophils	513.1 (399.6) ^a		663.0 (586.1) ^a		476.4 (332.8) ^a		NS		Mann-Whitney
Relative value of eosinophils (%)	7.73 (5.13) ^a		9.15 (6.15) ^a		7.38 (4.82) ^a		NS		ANOVA

NS: not significant.

^a Mean and standard deviation.

aforementioned variables were found to be associated with the infection (**Tables 3** and **4**).

Atopic and non-atopic children showed no statistical difference with regard to seroprevalence (19.7% vs 15.7%; p=0.68).

Discussion

The overall seroprevalence of toxocariasis detected in this study (19%) was similar to that found in another study in Brazil,²² but lower than in two other Brazilian studies.⁵ In a survey conducted in the same region with children, regardless of the presence or absence of atopy, seroprevalence was lower, and the age group examined involved 1- to 15-year-olds.¹² Differences in seroprevalence may be due to samples with different characteristics. The purpose of this study was to determine the possibility of an association between human toxocariasis and atopy in a population of children; however, no such association was observed in this study. Our results differed from those reported by researchers in the

Netherlands,^{13,16} who found a significant association between the seroprevalence of *Toxocara* spp. and atopic asthma in children. It should be noted that the majority of studies on toxocariasis linked to allergy focus solely on asthma.^{14–15,23–24} Hence, they differ from the present study, which comprised a sample of atopic children with chronic respiratory conditions such as allergic asthma and rhinitis, pneumonia and cutaneous symptoms, and compared positivity for toxocariasis with allergic alterations in general. The current study indicates a considerable seroprevalence of human toxocariasis in atopic children (19%), which is a finding similar to that of a study conducted in Malaysia, where a prevalence of 21% was found in children with asthma, without any significant association with age, sex, the presence of dogs or cats in the house and the type of dwelling.¹⁴

Factors such as gender and age were not found to be associated with infection, which is consistent with another study carried out in the same region.¹² The average age of the atopic and non-atopic seropositive children was around 9 years, which is consistent with the age group (8 months to 10 years of age) with a

Table 3. Socio-demographic and behavioral profile of non-atopic children (n=51) seropositive and negative for *Toxocara* spp. surveyed (Nov 2011 to Mar 2013) at the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Federal University of Uberlândia Clinical Hospital

Variables	Number	Frequency	Positive		Negative		OR (CI 95%)	p-value	Statistical test
			n	%	n	%			
Age		8.78 (2.69) ^a	9.37 (1.99) ^a		8.67 (2.80) ^a			NS	ANOVA
Sex									
Female	21	41	3	14	18	86	0.65 (0.10–4.05)	NS	Fisher's exact test
Male	30	59	5	17	25	83			
House									
With a yard	39	77	7	19	32	82	0.42 (0.08–3.93)	NS	Fisher's exact test
Without a yard	12	24	1	8	11	92			
Owns a cat or dog									
Yes	24	47	6	25	18	75	4.0 (0.63–45.5)	NS	Fisher's exact test
No	27	53	2	7	25	93			
The animal lives									
Outside the house	15	63	3	20	12	80	0.5 (0.05–5.0)	NS	Fisher's exact test
Inside the house	9	38	3	33	6	67			
Animal dewormed									
Yes	19	79	4	21	15	79	0.41 (0.03–6.60)	NS	Fisher's exact test
No	5	21	2	40	3	60			
Geophagist									
Yes	6	12	1	17	5	83	1.0 (0.02–12.18)	NS	Fisher's exact test
No	45	88	7	16	38	84			
Onychophagist									
Yes	22	43	2	9	20	91	0.3 (0.03–2.50)	NS	Fisher's exact test
No	29	57	6	21	23	79			
Frequency in sandboxes in parks, squares and schools									
Yes	37	73	6	16	31	84	1.15 (0.17–3.2)	NS	Fisher's exact test
No	14	28	2	14	12	86			

NS: not significant.

^a Mean and standard deviation.

higher prevalence observed by other researchers.¹⁰ The results of this study were similar to those of several others,^{11,25} suggesting that this age group is in closer contact with the parasite. Similar to the reports of other researchers,^{10,12,25} boys were more seropositive, which may be indicative of differences in behavior or interaction with the environment, i.e., greater exposure to the peridomestic environment during leisure activities and play, resulting in increased exposure to *Toxocara* spp. eggs.^{12,26}

The presence or absence of a front or back yard in homes was uncorrelated with infection in either of the groups under study. The presence of sand, earth or cement around the home is a characteristic that may favor infection by human toxocariasis. Moreover, one of the factors that may increase the risk of infection is the peridomestic presence of dogs and cats. Characteristics related to the care of these animals, such as the place where the animal lives and defecates, and veterinary care such as deworming, are important in the study of the transmission of toxocariasis, although they are factors rarely addressed in

epidemiological studies. In this current study, these factors were not related to infection as most of the animals lived and defecated outside the dwellings, and according to their owners, were dewormed regularly, which can contribute to reduce the transmission of human toxocariasis. Most of the infected children had dogs or cats at home, but owning animals did not prove to be associated with infection in either of the groups. This is in agreement with other studies^{27–28} that also found no association between infection and owners or professionals working with dogs. Other researchers^{10,29} also found no association between toxocariasis and the presence of dogs and/or cats at home, although some studies^{3,12} mention a relationship.

Overall, in this study there was no statistical difference between infection and habits such as geophagy, onychophagy and playing in sandboxes in parks, squares and schools, as has also been reported by other researchers.²⁹ Most of the seropositive children, both atopic and non-atopic, played in public places with sand or earth. Parents or guardians found it quite difficult to answer this question,

Table 4. Clinical and laboratory profile of non-atopic children (n=51) seropositive and negative for *Toxocara* spp. surveyed (Nov 2011 to Mar 2013) at the Pediatric Allergy and Immunology Outpatient Clinic of the Federal University of Uberlândia Clinical Hospital

Variables	Number n	Frequency %	Positive		Negative		OR (CI 95%)	p-value	Statistical test
			n	%	n	%			
Relatives with allergies									
Yes	30	59	3	10	27	90	0.36 (0.04–2.15)	NS	Fisher's exact test
No	21	41	5	24	16	76			
Abdominal pain									
Yes	20	39	3	15	17	85	0.91 (0.12–5.46)	NS	Fisher's exact test
No	31	61	5	16	26	84			
Chronic cough									
Yes	15	29	2	13	13	87	0.77 (0.06–5.12)	NS	Fisher's exact test
No	36	71	6	17	30	83			
Pneumonia									
Yes	18	35	1	6	17	94	0.22 (0.04–2.0)	NS	Fisher's exact test
No	33	65	7	21	26	79			
Cutaneous symptoms									
Yes	19	37	3	16	16	84	1.0 (0.13–6.04)	NS	Fisher's exact test
No	32	63	5	16	27	84			
Eosinophilia									
Yes	48	94	1	33	2	67	2.84 (0.04–61.9)	NS	Fisher's exact test
No	75	62	7	15	41	85			
Absolute value of eosinophils	225.2 (155.7) ^a		284.6 (215.3) ^a		214.2 (142.6) ^a		NS		ANOVA
Relative value of eosinophils (%)	3.23(2.19) ^a		3.0(2.4) ^a		3.27(2.18) ^a		NS		ANOVA

NS: not significant.

^a Mean and standard deviation.

since in most cases the children spend most of their time at school or in the care of others. Another study also reported difficulty in obtaining accurate information about these aspects,⁵ and found no association between geophagy and onychophagy with toxocariasis. However, Figueiredo et al. reported that contact with the ground was a factor associated with infection, suggesting that *Toxocara* spp. eggs may be present in these locations and may be a source of infection by finger-to-mouth transfer.⁵

The literature contains no data that correlates the presence of allergies (in general) in close relatives with positivity for toxocariasis in children. Moreover, no statistical correlation between these variables was found in the current study. Other studies also found no relationship between toxocariasis and the presence of allergies in relatives, although those studies focused only on relatives with asthma.^{11,15,24}

Abdominal pain and chronic cough were not associated with infection in either group in this study, nor in other studies.^{5,10,12,29} Clinical findings such as pneumonia, rhinitis or cutaneous symptoms were not associated with infection, corroborating the findings of others.⁵ In contrast, a survey conducted in Peru found an association between pulmonary symptoms such as asthma syndrome, bronchitis or dry cough and toxocariasis.¹⁰

Numerous studies of asthma and toxocariasis have been conducted.^{14,15,23,24} The present study found no statistical relationship between these two variables, contrary to other studies,^{5,13–14} which suggested that there is a relationship between the

development of asthma in children and *Toxocara* infection. A survey of elementary school children demonstrated an association between asthma and bronchitis, with seroprevalence for *Toxocara* spp.¹³ According to the authors, parasites such as *Toxocara* spp., which induce IgE production, result in non-specific stimulation of allergic symptoms in children prone to atopy. Like the findings of the present study, other researchers found no association between the seroprevalence of *Toxocara* and allergic reactions such as asthma and chronic bronchitis.^{15,30}

Hematological changes such as eosinophilia have been reported in some studies on toxocariasis.⁵ In a survey of elementary school children,¹³ a considerably larger number of eosinophils was found in children seropositive for *Toxocara* compared to seronegative children; however, this study found no association, which is consistent with other findings.¹² None of the children involved in the present study showed signs of hepatomegaly or splenomegaly. Other studies found a significant relationship between toxocariasis and hepatic symptoms, albeit no relationship with splenomegaly.^{5,10}

This study had limitations. Many children did not participate in the study because they had skin lesions in the area of the skin prick test, or because they were under constant treatment with anti-inflammatory or antihistamine drugs. Another factor was the difficulty in finding parents or guardians who would collect and deliver stool samples correctly. Finally, this group of children requires special attention and many parents and guardians

were not willing to have their children participate in any kind of research, notwithstanding its possible benefits.

Conclusions

The current study confirmed a significant seroprevalence of *Toxocara* spp. in children in the region, albeit not statistically correlated with atopy. Further research involving epidemiology and clinical and laboratory variables should be conducted to evaluate this important health problem that mostly affects children.

Authors' contributions: DFG participated in all the stages of the work; FMP, PPC, SZL and JSM assisted in the serological part of the study, the standardization of tests and data analysis; KCPM and BAP assisted in the collection of biological material and questionnaires, in stool and skin tests and in data analysis; GRSS, EAT and KPF were responsible for recruiting the children and for their clinical analysis, exams and prick tests; JEL was in charge of statistics and analysis; MCC designed the study and directed its implementation, critically reviewed the manuscript and assisted with stool tests. All authors read and approved the final manuscript. DG and MC are guarantors of the paper.

Acknowledgments: The authors would like to thank everyone who participated directly and indirectly in the research, as well as to the Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG) and the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (USP).

Funding: This study was supported by the Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) [APQ-02648-10].

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia Protocol [083/10] and by the Research Ethics Committee of the São Paulo Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo [CPE-IMT 2010/086].

References

- 1 Carvalho EA, Rocha RL. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. *J Pediatr (Rio J)* 2011;87:100–10.
- 2 Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. Washington, PP: ASM Press; 2001.
- 3 Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, Morasson B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol* 2001;39:1–11.
- 4 Taylor MRH, Holland CV. Toxocariasis. In: Gillespie SH, Pearson RD, editors. Principles and Practice of Clinical Parasitology. London: John Wiley; 2001. p501–20.
- 5 Figueiredo SD, Taddei JA, Menezes JJ et al. Clinical-epidemiological study of toxocariasis in a pediatric population. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81:126–32.
- 6 Cooper PJ. *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma? *Clin Exp Allergy* 2008;38:551–3.
- 7 Pinelli E, Aranzamendi C. *Toxocara* infection and its association with allergic manifestation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2012;12:33–44.
- 8 Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P. La toxocarose une zoonose helminthique majeure [in French]. *Red Med Vet* 1994;145:611–27.
- 9 Stensvold CR, Skov J, Moller LN et al. Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1372–3.
- 10 Roldán WH, Cavero YA, Espinoza YA et al. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the Amazonian city of Yurimaguas, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010;52:37–42.
- 11 Mendonça LR, Veiga RV, Dattoli VC et al. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1886.
- 12 Teixeira CR, Chieffi PP, Lescano SA et al. Frequency and risk factors for toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:251–5.
- 13 Buijs J, Borsboom G, Renting M et al. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J* 1997;10:1467–75.
- 14 Chan PW, Anuar AK, Fong MY et al. *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. *Pediatr Int* 2001;43:350–3.
- 15 Sharghi N, Schantz PM, Caramico L et al. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. *Clin Infect Dis* 2001;32:111–16.
- 16 Buijs J, Borsboom G, van Gemund JJ et al. *Toxocara* seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. *Am J Epidemiol* 1994;140:839–47.
- 17 Pinelli E, Brandes S, Dormans J et al. Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2008;38:649–58.
- 18 Ownby DR. Allergy testing: in vivo versus in vitro. *Pediatr Clin North Am* 1988;35:995–1009.
- 19 de Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979;32:284–8.
- 20 Elefant GR, Shimizu SH, Sanchez MC et al. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Lab Anal* 2006;20:164–72.
- 21 Savigny DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol* 1975;61:781–2.
- 22 Anaruma Filho F, Chieffi PP, Correa CRS et al. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:303–7.
- 23 Kustimur S, Dogruhan Al F, Oguzulgen K et al. *Toxocara* seroprevalence in adults with bronchial asthma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:270–4.
- 24 Kuk S, Ozel E, Oguzturk H et al. Seroprevalence of *Toxocara* antibodies in patients with adult asthma. *South Med J* 2006;99:719–22.
- 25 Lynch NR, Hagel I, Vargas V et al. Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. *Parasitol Res* 1993;79:547–50.
- 26 Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981;3:230–50.
- 27 Glickman LT, Cypress RH. *Toxocara* infection in animal hospital employees. *Am J Public Health* 1977;67:1193–5.
- 28 Jacobs DE, Woodruff AW, Shah AL, Prole JH. *Toxocara* infections and kennel workers. *Br Med J* 1977;1:51.
- 29 Mattia S, Colli CM, Adami CM et al. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. *J Helminthol* 2012; 86:440–5.
- 30 Gonzalez-Quintela A, Gude F, Campos J et al. *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:317–24.