

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Padronização do teste ELISA utilizando dois
extratos antigênicos de *Strongyloides ratti*,
Sandground, 1925 para o diagnóstico da
estrongiloidíase humana.**

Luciana Pereira Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG
JUNHO - 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Padronização do teste ELISA utilizando dois
extratos antigênicos de *Strongyloides ratti*,
Sandground, 1925 para o diagnóstico da
estrongiloidíase humana.**

Luciana Pereira Silva

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa Cruz

Orientadora

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG

JUNHO - 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Padronização do teste ELISA utilizando dois
extratos antigênicos de *Strongyloides ratti*,
Sandground, 1925 para o diagnóstico da
estrongiloidíase humana.**

Luciana Pereira Silva

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM ____ / ____ / ____ NOTA ____

Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz
orientadora membro nato da banca examinadora.

Prof^a Ms. Flávia Andrade C. Borges
segundo membro da banca examinadora.

Prof^a Ms. Joely Ferreira Figueiredo
terceiro membro da banca examinadora.

Uberlândia, ____ de _____ de 1998.

“Os seres humanos só podem descobrir novos oceanos, se eles
tiverem a coragem de perder a terra de vista”

(Autor desconhecido)

Dedico

A minha mãe **Maria das Graças** e ao meu pai **Amélio** que souberam compreender todos os momentos de ausência em casa em dedicação aos estudos.

Ao meu amor **Regildo Márcio** que se tornou um estímulo a mais para continuar buscando meus ideais.

A **DEUS** o provedor da vida e do tempo para a realização de todo propósito debaixo dos céus, o qual concedeu-me saúde, paz e oportunidades.

AGRADECIMENTOS

Somos uma somatória de tudo que nós aprendemos de todos aqueles - grandes ou pequenos - que nos ensinam. Eu sou grata pela inspiração e sabedoria dos homens e mulheres que me acompanharam durante esta caminhada enviados por DEUS e pelas fontes e raízes de sabedoria transgeracionais que eles me deixaram.

Eu também sou grata à Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Costa Cruz cuja profissionalidade me inspirou a continuar a cumprir meu propósito orientando e contribuindo para a realização deste trabalho.

No próprio desenvolvimento e produção deste trabalho, eu sinto uma imensa gratidão a:

Minha preciosa mãe, Graça, e meu pai, Amélio que não mediram esforços para eu completar mais esta etapa de minha vida.

À Ms. Flávia Andrade Chaves Borges e Ms. Joely Ferreira Figueiredo pela ampliação em clareza e coerência deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª-Dulcinéia Maria Barbosa Campus por conceder larvas de *Strongyloides ratti* por meio de intercâmbio científico.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia pela paciência, auxílio e compeensão na realização da metodologia; em especial à Maria do Rosário que passou horas após o expediente me acompanhando e ensinando com carinho, paciência e amizade.

À amiga Alice de Fátima Amaral pelo companheirismo, conversas agradáveis e participação nos momentos de alegria e dificuldades.

À Arlete e Roberto por permitirem a realização deste trabalho no Laboratório de Análises Clínicas do H.C.-UFU auxiliando nas coletas de soros.

À amiga Kely "San" com seu jeito otimista me estimulando a agir com minhas próprias atitudes.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização deste trabalho.

E, sobre tudo a Deus.

Obrigada.

RESUMO

O *Strongyloides ratti* é um helminto de ratos silvestres que infecta facilmente o rato branco e pode ser mantido em laboratório produzindo um grande número de larvas filarióides. Este trabalho teve como objetivo padronizar o emprego deste antígenos (*S. ratti*) frente aos extratos salino e alcalino na detecção de anticorpos IgG circulantes pelo teste ELISA, avaliar reações cruzadas com outras parasitoses e comparar os resultados com a reação de imunofluorescência indireta-IgG. Soros de 186 indivíduos foram analisados, sendo 61 pacientes que estavam eliminando larvas de *Strongyloides stercoralis* nas fezes, 60 de indivíduos controles (estudantes universitários) os quais foram realizados exames parasitológicos pelos métodos de Baermann Moraes e Hoffmann, Pons e Janer em três amostras fecais e 65 pacientes com outras parasitoses triados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *S. ratti* foi obtido de cultura de fezes de *Rattus rattus* infectados experimentalmente. Às placas de ELISA contendo 10µg/ml de extrato salino ou alcalino de *S. ratti* foram adicionadas os soros padrão positivo, padrão negativo e soros testes na diluição de 1/20 e posteriormente seriada na razão dois. O título ideal do conjugado IgG de coelho anti-IgG humano peroxidase foi de 100 para ambos os extratos. Considerou-se positiva a reação nos títulos ≥ 80 . A sensibilidade do teste ELISA foi de 86,9% para o extrato salino e de 93,4 % para o extrato alcalino. A I.F.I.-IgG para *S. ratti* segundo COSTA-CRUZ *et al.* (1997) apresentou sensibilidade de 93,4%. As especificidades foram iguais a 96,9% para os três testes imunológicos. Conclui-se que os extratos antigênicos salino e alcalino *S. ratti* podem ser empregados no teste ELISA como auxílio diagnóstico. Diante da disponibilidade de obtenção do antígeno em laboratório, praticidade de preparo, rendimento de concentração protéica superior ao extrato salino e não havendo diferença significativa entre a sensibilidade e especificidade obtidas nos resultados dos extratos antigênicos, a utilização do extrato alcalino de *S. ratti* é recomendada como antígeno no diagnóstico da estrongiloidíase humana por meio do teste ELISA.

Palavras chave: *Strongyloides ratti*, estrongiloidíase, teste ELISA, Imunodiagnóstico, IgG.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	8
3 – MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. OBTENÇÃO DE <i>S. RATTI</i>	9
3.1.1. Método de Looss (IN: NEVES et al., 1995)	10
3.1.2. Método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948).....	10
3.2. PRODUÇÃO DE EXTRATOS ANTIGÊNICOS SOLÚVEIS DE <i>S. RATTI</i>	11
3.2.1. Extrato salino.....	11
3.2.2. Extrato Alcalino.....	11
3.3. OBTENÇÃO DE SOROS	11
3.3.1. Soros controles de indivíduos sadios.....	12
3.3.1.1. Método de Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934).....	13
3.3.2 – Soros de pacientes com outras parasitoses.....	14
3.3.3. Soros de pacientes com <i>estrongiloidiase</i>	14
3.3.4. Soros padrões positivo e negativo	14
3.4. PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA FRENTE AOS DOIS ANTÍGENOS	15
3.4.1. Determinação da quantidade dos antígenos e titulação do conjugado imunoenzimático-IgG	15
3.4.2. Teste imunoenzimático ELISA.....	15
3.5. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - IGG.....	16
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
3.7. NORMAS DE BIOSSEGURANÇA.....	17
4 - RESULTADOS	18
4.1. OBTENÇÃO DE <i>STRONGYLOIDES RATTI</i>	18
4.2. PRODUÇÃO DE EXTRATOS ANTIGÊNICOS SOLÚVEIS DE <i>S. RATTI</i>	18
4.3. OBTENÇÃO DE SOROS	18
4.3.1. Soros controles de indivíduos sadios.....	18
4.3.2. Soros de pacientes com outras parasitoses.....	19
4.3.3. Soros de pacientes com <i>estrongiloidiase</i>	19
4.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA FRENTE AOS DOIS ANTÍGENOS.....	19
4.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA-IGG.....	21
4.5.1 Comparação do ELISA com o I.F.I.-IgG para <i>S. ratti</i>	21
5 - DISCUSSÃO	32
6 - CONCLUSÃO	36
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8 - ANEXO	48

1 – INTRODUÇÃO

Strongyloides stercoralis (Bavay, 1876) é o agente etiológico da estrogiloidíase humana que foi visualizado pela primeira vez em 1876, pelo médico francês Louis Normand, na cidade de Toulon-França, ao examinar fezes diarréicas de soldados procedentes da Cochinchina, antigo Vietnã. Bavay, farmacêutico colaborador de Normand, classificou as formas parasitas como *Anguillula stercoralis* encontradas na luz intestinal e como *A. intestinalis* para os obtidos em necropsia. Em 1911, Leuckart demonstrou serem as formas *stercoralis* e *intestinalis* pertencentes à mesma espécie heterogenética, com uma forma parasita partenogenética e outra de geração de vida livre bissexuada, passando a denominá-la *Strongyloides stercoralis* (PESSOA, MARTINS, 1982; PIRES, DREYER, 1993; GROVE, 1996).

O nematódeo *Strongyloides* sp., pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabdiasoidea. A família Strongyloididea contém apenas um gênero *Strongyloides* (LEVINE, 1979) composto por 52 espécies dentre as quais somente três acometem o homem: *S. stercoralis*, *S. fulleborni* von Linstow, 1905 e *S. fulleborni*-“like”. A primeira espécie tem distribuição mundial, a segunda é encontrada na África e nas

Filipinas e a terceira apenas na ilha da Nova Guiné (BARNISH, ASHFORD, 1989; PIRES, DREYER, 1993).

S. stercoralis é um helminto intestinal que causa infecção sistêmica, podendo acometer além do trato gastrointestinal, pulmões, sistema nervoso central, fígado, vias biliares, pâncreas, trato genitourinário e pele. As manifestações clínicas são bastante variáveis, dependendo do grau de infecção e do estado de imunidade do indivíduo (SCOWDEN, SCHAFFNER, STONE, 1978; MELTZER *et al.*, 1979; BRASITUS *et al.*, 1980; FERREIRA, 1991; TARANTO, 1995; GELBER, RODRIG, 1996).

A estrogiloidíase é uma doença parasitária cosmopolita que ocupa o 5º lugar dentre as helmintíases, com estimativa de 35 milhões de indivíduos infectados, principalmente em países tropicais e subtropicais. A importância clínica decorre de sua capacidade única entre os nematódeos de invadir tecidos extra-intestinais levando a quadros graves, potencialmente fatais em indivíduos imunocomprometidos seja por desnutrição, corticoideterapia, agentes citostáticos e raio X ou seja pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BOUREE *et al.*, 1981; PIRES, DREYER, 1993; ANDRADE NETO, ASSEF, 1996; IGLÉSIAS, 1997).

Esta helmintose apresenta distribuição mundial heterogênea. STUERCHLER (1981) definiu três regiões mundiais de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). No Brasil os relatos de prevalência variam entre 15% e 82% (GENTA, 1989) em função da idade da população estudada, bem como de diferenças geográficas e sócio-econômicas. As maiores taxas foram encontradas nos Estados de Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (FERREIRA, 1991).

MACHADO, COSTA-CRUZ (1998) demonstraram, por meio dos métodos parasitológicos de BAERMANN-MORAES (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e o de LUTZ (LUTZ, 1919), que Uberlândia-MG-Brasil é uma

região hiperendêmica, ao registrarem um índice de 13% de ocorrência para a infecção por *S. stercoralis* em crianças da área urbana.

Os métodos parasitológicos específicos para a detecção de larvas de *S. stercoralis* tem sido avaliado quanto a sensibilidade (CUTTI, ELOY, 1992; DREYER *et al.*, 1996) pois tem havido dificuldades de obtenção de resultados positivos em casos de infecções crônicas com baixo número de parasitos. Vários fatores podem estar influenciando nesses resultados como a falta de maturidade das larvas, a possibilidade de intermitência de postura e complicações decorrentes do próprio organismo constituindo, portanto, justificativas para a necessidade de se recorrer a padronização de novos métodos, dentre eles, métodos sorológicos para o diagnóstico desta parasitose (CAMPOS *et al.*, 1988; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995).

Parasitos intestinais podem evadir o sistema imune do hospedeiro para estabelecer e/ou manter a infecção (SOULSBY, 1987). No período de janeiro de 1990 a maio de 1995, FERREIRA *et al.*(1996), descreveram 24 casos de estrogiloidíase em pacientes com AIDS diagnosticados em exames de rotina do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), onde diferentes espécimes (escarro, fezes) foram analisados por variados métodos como: exames parasitológicos (método de Blagg ou MIFC “Mertiolate, Iodo, Formol, Conservante” e método de Baermann-Moraes), visualização direta ocasional na pesquisa de piócitos e hemácias (PPH), MIFC associado ao PPH e escarro, PPH e escarro, e pelo método de coloração de fezes (Kinoyun), demonstrando a ausência de metodologia laboratorial adequada para suporte aos exames clínicos.

O diagnóstico da estrogiloidíase é definitivo quando utiliza-se métodos específicos encontrando larvas do parasito nas fezes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948; PEREIRA, LIMA, DELGADO, 1961; SUKHAVAT *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995; SANTOS, PADILHA FILHO, 1996), no fluido

duodenal (JONES, ABADIE, 1954; BEAL, VIENS, GRANT, 1970; ASSEFA *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1994) ou ocasionalmente em outros tecidos ou fluídos de pessoas infectados (YASSIN, GARRET, 1980; AVRAM *et al.*, 1984; HUARATO SEDA *et al.*, 1990; MURTY *et al.*, 1994; TAKAYANAGUI *et al.*, 1995).

Recentemente, foi descrito um método em placa de agar para a cultura das fezes considerado mais sensível que os métodos parasitológicos usuais (ARAKAKI *et al.*, 1990; KOGA *et al.*, 1991; KOGA *et al.*, 1992; DE KAMINSKY, 1993; SALAZAR *et al.*, 1995).

O emprego de testes imunológicos na estrogiloidíase pode contribuir significativamente para o esclarecimento do diagnóstico clínico e para estudos soroepidemiológicos (ROSSI *et al.*, 1993a; CONWAY *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1995).

Nos últimos anos foram desenvolvidos diferentes testes de diagnóstico imunológico como teste cutâneo com extratos larvários (teste intradérmico) (PELLEGRINO, CHAIA, POMPEU MEMORIA, 1961; SATO *et al.*, 1986), aglutinação indireta com partículas de gelatina (SATO *et al.*, 1991), métodos para pesquisa de IgE (GILL, BELL, FIFIELD, 1979; LEAO, TOLEDO BARROS, MENDES, 1980; GENTA, DOUCE, WALZER, 1986; McRURY *et al.*, 1986), hemaglutinação indireta (GAM, NEVA, KROTOSKI, 1987), “immunoblot” (GENTA *et al.*, 1987; LINDO *et al.*, 1994), radioimunoabsorção (MESSIAS *et al.*, 1987; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995) e a reação de imunofluorescência (COUDERT *et al.*, 1968; DAFFALA, 1972; GROVE, BLAIR, 1981; GENTA, WEIL, 1982; CAMPOS *et al.*, 1988; BULLAMAH, COSTA-CRUZ, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

Na Universidade Federal Uberlândia, BULLAMAH, COSTA-CRUZ (1995) padronizaram o teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da estrogiloidíase humana empregando antígenos de *S. stercoralis*. COSTA-CRUZ

et al. (1997), padronizaram o teste de imunofluorescência empregando antígenos de *Strongyloides ratti* Sandground, 1925, recomendando o seu uso como antígeno heterólogo no diagnóstico da estrogiloidíase, devido a facilidade de obtenção deste no laboratório, já que não existe diferença estatisticamente significativa entre a sensibilidade e especificidade obtida e entre a correlação linear entre os títulos de anticorpos quando foram comparados antígenos homólogo e heterólogo.

Na literatura, a reação imunoenzimática, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tem sido descrita utilizando-se extratos salino de diversos parasitos para detecção de diferentes classes de imunoglobulinas nos soros humano de indivíduos infectados pelo *S. stercoralis*, os quais estão apresentados resumidamente no Quadro 1.

A composição antigênica de *Strongyloides* de roedores (*S. ratti* e *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934) foi comparada com a de *S. stercoralis* e observou-se que estas espécies podem ser utilizadas como antígenos heterólogos para o diagnóstico sorológico no lugar do antígeno do *S. stercoralis* provendo uma fonte constante e segura de antígeno em laboratório (GROVE, BLAIR, 1981; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995).

A dificuldade de obtenção de larvas de *S. stercoralis* tem sido um fator limitante para o desenvolvimento de reações mais sensíveis e específicas que possam ser empregadas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase. Diante disto, é conveniente a padronização e utilização de antígenos provenientes de *S. ratti*. O *S. ratti* é um helminto de ratos silvestres que infecta facilmente o rato branco e pode ser mantido em laboratório produzindo um grande número de larvas filarióides a partir de culturas de fezes de ratos experimentalmente infectados, o que simplifica a obtenção de extratos antigênicos (PELLEGRINO, CHAIA, POMPEU MEMORIA, 1961; ROSSI *et al.*, 1993a).

A técnica de ELISA é extremamente econômica no que se refere ao uso de reagentes e particularmente sensíveis na detecção de anticorpos, além do grande número de amostras que podem ser testadas num curto período de tempo (MALE, STEWARD, 1997).

Neste trabalho propõe-se alternativas do diagnóstico laboratorial da estrogiloidíase por meio da padronização do método imunológico ELISA para a detecção de anticorpo IgG em amostras de soros humano, empregando dois diferentes extratos antigênicos de *S. ratti*.

Quadro 1 -Teste ELISA no diagnóstico da estrongiloidíase em amostras de soros humano.

Extrato Antigênico	Amostra N ^o	Imunoglobulina	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	“Diluição de corte”	Autor/Ano
Salino	51 Infectados	IgG	82,0	N.D.	8	NEVA, GAM, BURKE, 1981.
<i>S. stercoralis</i>	44 Controles		84,0	N.D.		
<i>S. ratti</i>						
Salino	68 Infectados	IgG	83,8	90,2	8	GAM, NEVA, KROSTOSKI, 1987
<i>S. stercoralis</i>	112 Controles		80,8	83,9		
<i>S. ratti</i>						
Salino	27 Infetados	IgG			16	BRASIL <i>et al.</i> , 1988.
<i>S. stercoralis</i>	17 Controles		92,0	82,0		
Salino	268 Infectados	IgG			8	GENTA, 1988.
<i>S. stercoralis</i>	649 Controles		88,0	99,0		
Salino	40 Infectados	IgG			200	CONWAY <i>et al.</i> , 1993a
<i>S. stercoralis</i>	20 Controles		100	58,0		
Salino	100 Infectados	IgG			200	CONWAY <i>et al.</i> , 1993b
<i>S. stercoralis</i>	125 Controles		91,0	70,4		
Salino	27 Infectados	IgG	85,2	N.D.	8	ROSSI <i>et al.</i> , 1993
<i>S. stercoralis</i>	12 Controles	IgA	77,8	N.D.		
		IgE	59,6	N.D.		
Salino	20 Infectados	IgG			200	LINDO <i>et al.</i> , 1994
<i>S. stercoralis</i>	139 Controles		80,0	94,0		
pré-absorvido			85,0	97,0		
<i>O. gutturosa</i>						

N^o = Número*O. gutturosa* = *Onchocerca gutturosa*

N.D. = Não Descrito.

2 - OBJETIVOS

- 2.1 - Padronizar o teste imunoenzimático ELISA - IgG frente aos extratos salino e alcalino de *Strongyloides ratti*.
- 2.2 - Comparar os dois antígenos na detecção de anticorpos IgG circulantes pelo teste ELISA.
- 2.3 - Avaliar reações cruzadas com outras parasitoses.
- 2.4 - Comparar os resultados com a reação de imunofluorescência indireta - IgG frente ao antígeno *S. ratti*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de *Strongyloides ratti*

Para a obtenção de *S. ratti* foram utilizadas fezes de ratos da espécie *Rattus rattus* mantidos experimentalmente infectados em laboratório.

Os animais, foram inoculados com 2000 larvas de *S. ratti* por via subcutânea e após dez dias foram colocados em gaiolas metálicas, forradas com papel umedecido em água, permanecendo por uma noite em defecação. Posteriormente, fez-se a coleta das fezes para proceder o cultivo pelo método de Looss conforme descrito por NEVES *et al.*(1995) (item 3.1.1). No 5º dia, foram obtidas larvas pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) (item 3.1.2), sendo o material concentrado por centrifugação. A contagem de larvas foi realizada em três lâminas contendo, cada uma, 10 µl da suspensão de parasitas medidos por pipeta automática. Através da média das três lâminas, verificou-se quantas larvas existiam em 1 ml.

Parte das larvas obtidas foram utilizadas para manutenção do ciclo evolutivo do *S. ratti* em *R. rattus* e a outra parte foi mantida à -20°C para preparo dos antígenos.

3.1.1. Método de Looss

A coprocultura foi realizada utilizando o método de Looss conforme descrito por NEVES *et al.* (1995) misturando-se partes iguais de material fecal e carvão vegetal triturados em grãos pequenos ligeiramente umedecidos e posteriormente colocados em placas de Petri, de modo a formar uma camada não espessa, que permaneceu em repouso em estufa incubadora para B.O.D. (Fanem, São Paulo) a temperatura de 25°C por cinco dias. Após este procedimento foram recolhidas as larvas pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948).

3.1.2. Método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948)

Em um suporte de madeira foram colocados funis de vidro com diâmetro de 11,5 cm, em cujos tubos foram acoplados mangueiras de borracha de 10 cm, no qual foi introduzido um tubo de ensaio de vidro de 10 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, obliterando-se desta forma a passagem de água.

Cada funil foi preenchido com água de torneira a temperatura de 45°C, sobre o mesmo foi colocado uma tela metálica (100 malhas por cm²) e gaze dobrada em quatro, sendo posteriormente depositada sobre a mesma aproximadamente 10 g de fezes. A gaze com a amostra fecal foi deixada em contato com a água, em repouso por uma hora. Após este período o tubo de ensaio foi retirado com cerca de 5 a 7 ml de solução contendo água e possíveis larvas.

Após concentração por centrifugação (FANEM, São Paulo, Brasil) as larvas foram lavadas em tampão fosfato pH 7,2 por centrifugação a 1500 rpm durante três minutos por cinco vezes e conservadas a -20°C até o momento do uso.

3.2. Produção de extratos antigênicos solúveis de *S. ratti*

3.2.1. Extrato salino

Às larvas de *S. ratti* obtidas foram descongeladas, ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato 0,15 M pH 7,2 (PBS) e posteriormente rompidas, para extração protéica, através de ultra som em quatro períodos de 20 segundos em banhos de gelo. O material foi deixado sob agitação por 18 horas à 4°C para extração dos antígenos e centrifugação a 15.000 rpm por 30 minutos à 4°C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de LOWRY (LOWRY *et al.*, 1951).

3.2.2. Extrato Alcalino

Às larvas de *S. ratti* obtidas foram adicionadas 1 ml de NaOH 0,15 M, onde permaneceram por seis horas à 4°C sob agitação lenta. Após a agitação, colocou-se lentamente 0,5 ml de HCl 0,3 M até atingir o pH de 7,0 até 7,5. Seguindo-se centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos à 4°C em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5C plus, USA), sendo o conteúdo protéico do sobrenadante dosado pelo método de LOWRY (LOWRY *et al.*, 1951).

3.3. Obtenção de soros

Foram obtidos 186 soros sendo uma amostra de 10 ml de sangue de cada indivíduo, previamente triados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), colhidos por punção venosa e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia. Os soros foram obtidos por centrifugação a 3000 rpm por cinco minutos e armazenados à -20°C até o momento do uso.

Para a coleta do material fecal e do sangue de pacientes com outras parasitoses e pacientes com estrogiloidíase foi elaborado um termo de

consentimento, que segue em anexo, no qual os pacientes ou os responsáveis declaram estar cientes dos objetivos do trabalho bem como da importância de sua colaboração para o mesmo.

3.3.1. Soros controles de indivíduos sadios

Foram obtidos 60 soros controle de indivíduos assintomáticos, estudantes universitários que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelos métodos de Baermann-Moraes (item 3.1.2) e pelo método de Hoffmann, Pons e Janer (item 3.3.1.1.) não foram detectadas larvas de *S. stercoralis* ou outra parasitose e que negaram história anterior de estrogiloidíase, sendo 41 do sexo feminino e 19 do sexo masculino com idade variando de 19 a 47 anos.

Após obtenção de 5 ml de solução (água e possíveis larvas) pelo método de Baermann-Moraes, o material foi centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado deixando no tubo aproximadamente 1 ml de líquido para ser examinado. Com a finalidade de imobilizar as possíveis larvas existentes, impedindo sua migração pela parede do tubo e evitar contaminações no ambiente laboratorial adicionou-se ao material centrifugado três gotas de formol a 10% e para melhor visualização das estruturas destas larvas foram adicionadas três gotas de lugol (1g de Iodo em 100 ml de água destilada e 10 g de Iodeto de Potássio).

Sobre uma lâmina de 7,5 cm de comprimento por 2,5 cm de largura colocou-se duas gotas do sedimento e cobertos com lamínula de 24mm x 24mm. As lâminas foram observadas em microscópio óptico binocular (OLYMPUS - CH2, Japão), em aumentos de 100 e 400 vezes.

3.3.1.1. Método de Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934)

Esse método foi utilizado para detecção de ovos, cistos ou larvas de enteroparasitas.

Em “becker” de 250 ml de capacidade, contendo cerca de 10 ml de água de torneira, foram depositadas 2 a 6 g de fezes, que ao serem desmanchadas por meio de bastão de vidro; acrescentou-se mais água, até completar um volume aproximado de 15 ml sob agitação constante. A suspensão foi filtrada, através de gaze cirúrgica dobrada quatro vezes, sobre tela metálica com 100 malhas por cm² e transferida para cálice cônico de sedimentação com 200 ml de capacidade. Os detritos retidos na gaze foram lavados com água corrente, agitando-os constantemente com o bastão de vidro, no mesmo cálice.

A suspensão assim preparada foi deixada em repouso durante 24 horas. Caso o sobrenadante estivesse turvo, era descartado cuidadosamente sem levantar ou perder o sedimento. Em seguida este foi novamente ressuspendido, completando-se o volume com água até um total de 200 ml e deixado em repouso por duas horas, período após o qual, descartou-se o sobrenadante, deixando no recipiente o sedimento para leitura. Foram preparadas três lâminas para cada amostra fecal.

Do sedimento foram colhidas duas gotas com auxílio de pipeta, as quais foram colocadas sobre lâminas (7,5 cm X 2,5 cm) e adicionou-se uma gota de lugol, homogeneizando, cobrindo com lamínula de vidro (24mm x 24mm) que posteriormente foram examinadas em microscópio óptico binocular (OLYMPUS - CH2, Japão) em aumento de 100 e 400 vezes.

Caso a leitura fosse negativa, eram preparadas mais duas lâminas para confirmação do resultado. Os resultados positivos foram acrescentados ao grupo controle pertencentes a indivíduos com outras parasitoses.

3.3.2 Soros de pacientes com outras parasitoses

Com o objetivo de verificar reatividade cruzada com outras parasitoses, nos métodos imunológicos, foram obtidos 65 soros de indivíduos, com diferentes parasitoses triados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU pelo método de Blagg ou MIFC “Mertiolate, Iodo, Formol, Conservante” (IN: NEVES *et al.*, 1995), sendo 37 do sexo feminino e 28 do sexo masculino com idade variando de 2 a 56 anos.

3.3.3. Soros de pacientes com estrogiloidíase

Foram obtidos 61 soros de indivíduos com diagnóstico comprovado da parasitose através da identificação de larvas de *S. stercoralis* no material fecal pelo método de MIFC (IN: NEVES *et al.*, 1995) realizado como rotina parasitológica no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. Destes 31 eram de indivíduos o sexo feminino e 30 do sexo masculino com idades que variaram de 4 a 80 anos.

3.3.4. Soros padrões positivo e negativo

O soro padrão positivo foi constituído de amostra de soro de um paciente com estrogiloidíase que apresentou larvas rabditóides do parasito pelo método de MIFC (IN: NEVES *et al.*, 1995).

O soro padrão negativo foi constituído de amostra de soro de um indivíduo sadio assintomático, que em três exames parasitológicos de fezes pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917, MORAES, 1948) e o método de Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934) foram negativos para *S. stercoralis* ou outros parasitos e que não apresentaram história anterior de estrogiloidíase.

3.4. Padronização do teste ELISA frente aos dois antígenos

3.4.1. Determinação das concentrações dos antígenos e titulação do conjugado de coelho anti-IgG humana peroxidase.

Os antígenos salino e alcalino foram analisados separadamente pelo teste imunoenzimático ELISA no mesmo dia e hora, nas concentrações de 5µg/ml, 10 µg/ml e 20µg/ml. Utilizou-se soro padrão positivo e negativo na diluição de 1/20 em PBS pH 7,2 contendo Tween 20 (SIGMA, USA) a 0,05% e controles contendo PBS-Tween 20 frente as diferentes concentrações do Antígenos e PBS-Tween 20 na ausência de Antígenos na placa. O conjugado IgG de coelho anti-IgG humana marcado com peroxidase disponível no laboratório foi preparado segundo técnica descrita por WILSON, NAKANE (1978) nas diluições a 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 em PBS Tween 20 a 0,05%.

3.4.2. Teste imunoenzimático ELISA

Foram empregadas placas de poliestireno (DIFCO) como suporte para adsorção de 50 µl de cada um dos antígenos solúveis de *S. ratti* na concentração ideal determinada no item 3.4.1., isoladamente. As placas foram sensibilizadas à 4°C durante 18 horas em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Após este período e três lavagens de cinco minutos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2 contendo Tween 20 (SIGMA, USA) a 0,05% foram adicionados 50 µl de amostras de soros padrões positivo e negativo e soros sendo testados na diluição de 1/20 para triagem e diluídos na razão dois na posterior titulação. Após incubação por 45 minutos à 37°C e 3 lavagens de cinco minutos com PBS – Tween 0.05% foram adicionados 50 µl de conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase, no título ótimo determinado, por um período de 45 minutos à 37°C. Após três lavagens a reação foi revelada pela adição de 50 µl do substrato de H₂O₂ e solução cromógena de ortofenileno diamina (OPD),

preparado no momento do uso (10 µl de H₂O₂ 30% + 10 mg de OPD + 25 ml de tampão citrato fosfato pH 5,0). Após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µl de solução 2 N de H₂SO₄ e os valores da absorbância foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow, USA).

O limiar da reatividade (“cut off”) foi determinado pela média aritmética das densidades ópticas das amostras de soros padrões negativos acrescidos de dois desvios padrões para cada reação.

3.5. Reação de imunofluorescência indireta - IgG

Às lâminas contendo os cortes de *S. ratti* foram adicionados soros controle positivo e negativo e as amostras de soros obtidos dos pacientes na diluição de triagem de 1/20 em PBS, pH 7,2. Após 30 minutos à 37°C as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos (três vezes) e adicionou-se conjugado anti-IgG marcado com isotiocianato de fluoresceína no título ideal em azul de Evans 1%. Novamente, após 30 minutos a 37°C, as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos, três vezes e montadas, em glicerina alcalina pH 8,5. As reações foram avaliadas em microscópio de Imunofluorescência (OLYMPUS BH-2-RFC, Japão) equipado com lâmpada de mercúrio, filtro de interferência e filtro de barreira sendo os resultados expressos em títulos.

Os soros positivos foram diluídos na razão dois para titulação dos anticorpos circulantes. Foi considerado positivo os soros que apresentasse título ≥ 20 (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

3.6. Análise estatística

Foi utilizado o Teste de Distribuição Normal para duas proporções no nível de significância de 1% a 5% para comparação da sensibilidade e especificidade da teste imunoenzimático ELISA frente aos extratos salino e alcalino de *S. ratti* (SPIEGEL, 1993).

3.7. Normas de biossegurança

Todo o procedimento de colheita, manuseio do material biológico e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (CHAVES-BORGES, MINEO, 1997).

4 - RESULTADOS

4.1. Obtenção de *Strongyloides ratti*

Através do método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) obteve-se 350.000 larvas filarióides de *S. ratti* resultantes das culturas de fezes de *Rattus rattus* mantidos no laboratório.

4.2. Produção de extratos antigênicos solúveis de *S. ratti*

O número de larvas utilizadas para obtenção dos extratos salino e alcalino de *S. ratti* e as dosagens protéicas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) estão apresentados na Tabela 1.

4.3. Obtenção de soros

4.3.1. Soros controles de indivíduos sadios

A Tabela 2 apresenta a identificação dos 60 indivíduos sadios e os resultados dos testes imunológicos ELISA e I.F.I. para a detecção de anticorpo IgG anti - *S. ratti*.

4.3.2. Soros de pacientes com outras parasitoses

A Tabela 3 apresenta a identificação dos 65 casos de indivíduos controles com outras parasitoses e os resultados dos testes ELISA e I.F.I. para detecção de anticorpos IgG anti - *S. ratti*. A Tabela 4 identifica os parasitos intestinais diagnosticados nos diferentes casos.

4.3.3. Soros de pacientes com estrogiloidíase

A Tabela 5 apresenta a identificação dos 61 casos de estrogiloidíase segundo sexo, idade e sintomas.

4.4 Padronização do teste imunoenzimático ELISA frente aos dois antígenos

Os testes ELISA utilizando extratos salino e alcalino de *S. ratti*, realizados para a detecção de anticorpo IgG apresentaram boa *performace* com os padrões de reação positivo e negativo nitidamente reagentes e não reagentes, respectivamente.

As Figuras 1 e 2 apresentam as curvas de reatividade logarítmica obtidas na padronização dos testes imunoenzimáticos ELISA, respectivamente, para os extratos salino e alcalino de *S. ratti*.

Foram determinados como ideais a concentração de 10µg/ml para a sensibilização das placas para os dois extratos antigênicos, soros diluídos 1/20 e o título do conjugado como 100 para os dois extratos.

A Tabela 6 apresenta os resultados laboratoriais dos 61 casos de estrogiloidíase. Verificou-se que os títulos dos soros reagentes variam de 20 a 320 e de 20 a 640, respectivamente, na detecção de imunoglobulina G frente ao extrato salino e alcalino.

A Tabela 7 demonstra a distribuição da frequência dos títulos de anticorpos IgG detectados pelo Teste ELISA frente aos dois extratos antigênicos de *S. ratti* nos

186 soros testados. Pelos resultados obtidos foi necessário determinar o corte da reação no título ≥ 80 , uma vez que os soros sadios e os de outras parasitoses foram reagentes até o título de 40..

O teste ELISA possibilitou detectar anticorpos IgG circulantes em 53 (86,9%) e 57 (93,4%) dos pacientes com estrogiloidíase quando utilizou-se, respectivamente, os extratos salino e alcalino de *S. ratti* e a especificidade de 96,9% para os dois antígenos. Estatisticamente, no nível de significância de 1% a 5% no teste da distribuição normal envolvendo as duas proporções (sensibilidades para extratos salino e alcalino e especificidades nos dois extratos) não houve diferença significativa entre as reações utilizando os dois extratos antigênicos de *S. ratti*.

Entre os 61 casos de estrogiloidíase, oito (13,1%) pacientes mostraram título menor que 80 na reação com extrato salino (Tabela 7). Destes, seis (9,8%) estavam negativos para outros parasitas e não apresentavam outras infecções (caso 13, 14, 16, 26, 40, 50; Tabela 6), um (1,64%) paciente estava negativo para outros parasitas e apresentava infecção por toxoplasmose (caso 7; Tabela 6) e um (1,64%) estava parasitado por *E. coli* e *E. histolytica* e negativo para outras infecções (caso 45, Tabela 6).

No extrato alcalino dos 61 casos de estrogiloidíase estudados quatro (6,6%) pacientes mostraram títulos menores que 80 (Tabela 7). Destes, dois (3,3%) estavam negativos para outros parasitas e não apresentavam outras infecções (caso 14, 16; Tabela 6) e dois (3,3%) estavam negativos para outros parasitas e apresentavam infecção para toxoplasmose (caso 4, 7; Tabela 6).

Dos 125 soros controle, houve um caso (0,8%) de positividade frente aos dois extratos antigênicos pertencente a um paciente portador de *Enterobius vermicularis* (caso 33; Tabela 3 e 4). Dois (1,6%) casos de ancilostomídeos tiveram título 80, um no extrato salino total (caso 18; Tabela 3 e 4) e o outro no extrato alcalino (caso 34; Tabela 3 e 4).

A Figura 3 mostra a frequência de positividade dos títulos de anticorpos IgG detectados pela reação imunoenzimática ELISA frente aos extratos salino e alcalino de *S. ratti* em 61 soros de pacientes com estrogiloidíase, demonstrando que o pico de reagentes foram 80 e 160, respectivamente para extrato salino e alcalino.

4.5 Reação de imunofluorescência indireta-IgG

A Tabela 8 apresenta a distribuição dos títulos de anticorpos IgG detectados pelas reações de imunofluorescência indireta (I.F.I) frente ao antígeno *S. ratti* em soros de 61 pacientes com estrogiloidíase e em 125 controles. Foram verificados que os títulos dos soros reagentes variam de 20 a 2560.

Como padronizado por COSTA-CRUZ *et al.* (1997) foi considerado positivos os títulos de anticorpos ≥ 20 , portanto a sensibilidade do teste foi de 93,4% e a especificidade de 96,9% quando utilizado antígeno de *S. ratti*.

Entre os 61 casos de estrogiloidíase, quatro (6,6%) foram negativos (casos 16, 25, 26, 36; Tabela 6); sendo que houve confirmação do caso 16 reagindo negativamente no extrato salino e o caso 26 nos dois extratos. O caso 36 de um paciente com esquitossomose, reagiu somente no I.F.I.

Dos 125 controles, houve um paciente (caso 18) com ancilostomíase e um paciente (caso 33) parasitado com *Enterobius vermicularis* reagentes nos testes ELISA para os dois extratos e o I.F.I..

4.5.1 Comparação do ELISA com o I.F.I.-IgG para *S. ratti*

A Figura 4 compara a frequência de sensibilidade e especificidade do teste ELISA frente aos dois extratos e o teste I.F.I. para *S. ratti* para IgG. Verificou-se que a sensibilidade do extrato alcalino foi maior que a do extrato salino e igual ao do teste I.F.I., porém as especificidades foram iguais nos três testes. Não houve diferença significativa entre os testes ELISA-IgG frente aos dois extratos antigênicos e o teste I.F.I. - IgG anti - *S. ratti*.

Tabela 1 - Determinação da concentração de proteínas nos extratos antigênicos salino e alcalino de *Strongyloides ratti*.

Extrato antigênico de <i>S. ratti</i>	Número de larvas	Dosagem µg/ml
Salino	280.000	360
Alcalino	70.000	350

Tabela 2 - Identificação dos 60 indivíduos sadios e os resultados dos testes imunológicos para detecção de anticorpo IgG anti-*S. rattii*.

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	NATURALIDADE	CURSO	I.F.I.IgG <i>S. rattii</i>	ELISA IgG SALINO	<i>S. rattii</i> ALCALINO
1	LBS	F	22	Ribeirão Preto	Psicologia	negativo	20	20
2	SMS	F	23	Uberaba	Psicologia	negativo	negativo	40
3	LBE	F	23	Itumbiara	Veterinária	negativo	negativo	negativo
4	TMP	M	23	Rio de Janeiro	Medicina	negativo	negativo	negativo
5	PSVC	M	23	Franca	Agronomia	negativo	negativo	negativo
6	CBB	F	23	Ribeirão Preto	Medicina	negativo	negativo	20
7	AJM	M	25	Santo André	Medicina	negativo	negativo	negativo
8	PGM	F	30	Uberlândia	Biologia	negativo	negativo	negativo
9	RTSM	F	41	Belo Horizonte	Biologia	negativo	negativo	negativo
10	RSO	M	22	Araguari	Medicina	negativo	negativo	20
11	LAS	F	21	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	20
12	VM	F	21	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	negativo
13	ALN	M	21	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	negativo
14	RBV	M	21	Araguari	Odontologia	negativo	negativo	negativo
15	PFS	F	19	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	negativo
16	MFTS	M	22	Araguari	Engenharia	negativo	negativo	negativo
17	DC	M	22	Goiânia	Medicina	negativo	negativo	negativo
18	PBJ	M	20	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	20
19	HS	F	22	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	20
20	IRR	M	21	Sertãozinho	Medicina	negativo	40	40
21	GBF	M	23	Ribeirão Preto	Odontologia	negativo	negativo	negativo
22	AVS	F	23	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	negativo
23	FCF	M	24	Coromandel	Medicina	negativo	negativo	negativo
24	AM	M	25	Uberaba	Bioquímica	negativo	negativo	negativo
25	TAL	F	21	Lins	Medicina	negativo	negativo	negativo
26	RPC	M	21	Uberlândia	Odontologia	negativo	negativo	negativo
27	MFM	F	22	Goiânia	Medicina	negativo	40	40
28	LMO	F	28	Araxá	Fisioterapia	negativo	negativo	negativo
29	JAMM	M	21	Uberlândia	Medicina	negativo	negativo	negativo
30	NMS	F	34	Uberlândia	Biologia	negativo	40	40
31	ERS	F	25	Coromandel	Biologia	negativo	negativo	20
32	CL	F	28	Uberlândia	Biologia	negativo	40	20
33	AFA	F	23	Patos de Minas	Biologia	negativo	20	negativo
34	LPS	F	21	Uberlândia	Biologia	negativo	negativo	20
35	VP	F	22	Goiânia	Biologia	negativo	negativo	20
36	APMF	F	22	São Paulo	Medicina	negativo	40	40
37	RA	M	25	Ribeirão Preto	Biologia	negativo	20	20
38	CVF	F	22	Uberlândia	Biologia	negativo	negativo	20
39	NF	F	22	Araguari	Biologia	negativo	negativo	negativo
40	CC	F	21	Uberlândia	Psicologia	negativo	negativo	negativo
41	KYMS	F	25	Ipatinga	Biologia	negativo	40	20
42	FFAA	F	21	Cuiabá	Biologia	negativo	20	20
43	ACS	F	21	Ituiutaba	Biologia	negativo	40	20
44	TSS	F	21	Araguari	Biologia	negativo	40	40
45	ALR	F	47	Morada Nova	Enfermagem	negativo	20	negativo
46	JJ	F	21	Uberlândia	Biologia	negativo	negativo	negativo
47	MFP	F	24	Uberlândia	Biologia	negativo	20	20
48	EMT	F	24	Uberlândia	Biologia	negativo	40	20
49	RDS	M	21	Barretos	Veterinária	negativo	negativo	negativo
50	CA	M	21	Ituiutaba	Biologia	negativo	negativo	negativo
51	FGF	F	21	Brasília	Biologia	negativo	negativo	negativo
52	MJ	F	23	Uberlândia	Biologia	negativo	20	negativo
53	DS	F	25	Patrocínio	Biologia	negativo	negativo	negativo
54	MAO	M	23	São Paulo	Biologia	negativo	negativo	negativo
55	ACM	F	21	Cachoeira Alta	Biologia	negativo	negativo	negativo
56	BVS	F	23	Ituiutaba	Biologia	negativo	negativo	negativo
57	RCR	F	21	Salvador	Medicina	negativo	negativo	negativo
58	IMA	F	25	Uberlândia	Biologia	negativo	negativo	negativo
59	RSC	F	21	Uberlândia	Biologia	negativo	negativo	negativo
60	EL	F	24	João Pinheiro	Biologia	negativo	negativo	negativo

* "cut off" para I.F.I. e ELISA foram considerados nos títulos de 20 e 80, respectivamente.

Tabela 3 - Identificação dos 65 indivíduos controles com outras parasitoses segundo sexo, idade e sintomas e resultados dos testes imunológicos para detecção de IgG anti-*S. ratti*.

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	SINTOMAS	I.F.I. - IgG	ELISA - IgG <i>S. ratti</i>	
					<i>S. ratti</i>	SALINO	ALCALINO
1	YTD	M	21	Diarréia e dor abdominal	negativo	20	40
2	JLS	F	6	Epigastralgia	negativo	negativo	20
3	APCI	F	21	Diarréia	negativo	20	40
4	ERM	F	29	Diarréia e dor abdominal	negativo	20	40
5	JRL	M	2	Anemia ferropriva	negativo	negativo	20
6	RPS	M	56	Dor abdominal	negativo	negativo	negativo
7	IRFS	F	4	Assintomática	negativo	40	40
8	A	M	31	Assintomático	negativo	negativo	20
9	RNC	F	24	Pré-natal	negativo	negativo	20
10	FAVN	F	16	Pré-natal	negativo	negativo	negativo
11	GAS	F	19	Pré-natal - epigastralgia	negativo	negativo	negativo
12	JDSB	F	18	Pré-natal	negativo	negativo	40
13	ABS	M	4	Dor epigástrica	negativo	negativo	20
14	CM	F	23	Pré-natal	negativo	negativo	20
15	ESTL	F	23	Pré-natal	negativo	20	20
16	ES	F	29	Pré-natal - epigastralgia	negativo	20	20
17	CRSC	F	28	Diarréia e dor abdominal	negativo	20	40
18	LCS	F	28	Pré-natal dor abdominal	40	80	40
19	APM	M	26	Diarréia aquosa	negativo	40	40
20	CRA	F	18	Pré-natal	negativo	20	negativo
21	SMLS	F	21	Pré-natal dor abdominal	negativo	20	negativo
22	JAO	F	19	Pré-natal	negativo	20	negativo
23	AES	M	45	Diarréia	negativo	20	negativo
24	RDS	F	18	Epigastralgia	negativo	20	negativo
25	RSD	M	9	Náuseas e vômitos	negativo	20	negativo
26	MNS	F	20	Pré-natal	negativo	20	40
27	SSS	M	9	Dor abdominal	negativo	20	40
28	ABOS	M	4	Dor abdominal e anemia	negativo	negativo	negativo
29	LCM	F	2	Prurido anal e diarréia	negativo	negativo	negativo
30	NKA	F	5	Prurido anal-	negativo	negativo	negativo
31	VAO	M	5	Anemia ferropriva	negativo	negativo	negativo
32	ESMF	F	32	Assintomática	negativo	20	negativo
33	AFI	F	23	Pré-natal	80	80	80
34	JRS	M	41	Anemia ferropriva	negativo	negativo	80
35	MCNS	F	22	Pré-natal	negativo	negativo	negativo
36	VLO	F	31	Epigastralgia	negativo	negativo	negativo
37	VRM	F	37	Cefaléia e tonturas	negativo	20	40
38	OAA	F	45	Epigastralgia	negativo	20	40
39	CMS	M	23	Epigastralgia	negativo	40	20
40	AFRB	F	25	Assintomático	negativo	20	20
41	CF	M	22	Assintomático	negativo	20	20
42	KCG	F	2	Prurido anal	negativo	negativo	20
43	DHS	M	4	Prurido anal	negativo	negativo	40
44	MR	F	22	Pré-natal	negativo	40	40
45	CRSJ	M	27	Dor abdominal	negativo	negativo	negativo
46	VAFD	F	11	Vômitos	negativo	negativo	40
47	WAVS	M	2	Diarréia	negativo	negativo	negativo
48	ASA	F	11	Assintomático	negativo	negativo	40
49	JCO	M	6	Assintomático	negativo	20	40
50	ASN	M	5	Vômitos	negativo	negativo	20
51	JSSP	M	3	Prurido anal	negativo	negativo	40
52	MAS	F	37	Pré-natal	negativo	20	20
53	PAN	M	40	Assintomático	negativo	negativo	20
54	RMM	F	25	Assintomático	negativo	20	20
55	MSR	F	33	Assintomático	negativo	negativo	40
56	MFM	F	3	Prurido anal	negativo	negativo	40
57	ALC	M	70	Vômitos	negativo	negativo	negativo
58	GPS	F	1	Dermatite	negativo	negativo	20
59	DGA	F	5	Prurido anal	negativo	negativo	20
60	LBF	M	3	Gastroenterito	negativo	negativo	20
61	RFP	M	4	Assintomático	negativo	20	20
62	ALR	M	2	Prurido anal	negativo	negativo	20
63	RHFB	M	1	Prurido anal	negativo	negativo	20
64	MDGS	M	10	Prurido anal	negativo	negativo	20
65	AHM	M	2	Prurido anal	negativo	negativo	negativo

* "cut off" para I.F.I. e ELISA foram considerados nos títulos de 20 e 80, respectivamente.

Tabela 4 - Identificação e frequência das parasitoses intestinais nos 65 indivíduos controles com outras parasitoses.

Parasitas	Nº do Caso	Total
Monoparasitados		
Ancilostomídeos	6,15,18,19,34,38,52,57	8
<i>Enterobius vermiculares</i>	25,29,30,31,33,49,64	7
<i>Hymenolepis nana</i>	9,21,22,23,35,53	6
<i>Trichuris trichiura</i>	5,7,13,14,40,54	6
<i>Ascaris lumbricoides</i>	12,27,32,50,61	5
<i>Taenia</i> sp	17,37	2
<i>Giardia lamblia</i>	1,3,41,42,43,46,47,48,51,56,58,59,60,62,63,65	16
<i>Entamoeba histolytica</i>	11,44	2
Associações Parasitárias		
Ancilostomídeos e <i>A. lumbricoides</i>	39	1
Ancilostomídeos e <i>H. nana</i>	10	1
Ancilostomídeos e <i>E. histolytica</i>	36	1
Ancilostomídeos, <i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>	26	1
<i>E. histolytica</i> e <i>G. lamblia</i>	2,4	2
<i>E. histolytica</i> e <i>A. lumbricoides</i>	8	1
<i>E. histolytica</i> e <i>H. nana</i>	24	1
<i>E. histolytica</i> e <i>Taenia</i> sp	20	1
<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>	16	1
<i>A. lumbricoides</i> e <i>G. lamblia</i>	28	1

Tabela 5 - Identificação dos 61 casos de estrogiloidíase segundo sexo, idade e sintomas.

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	SINTOMAS
1	JP	M	41	Diarréia e dor abdominal
2	CGA	F	18	Pré-natal
3	ELS	M	16	Cefaléia moderada
4	CCP	F	18	Pré-natal
5	MNS	F	40	Diagnóstico GO preventivo
6	CAS	M	8	Dor abdominal
7	LAM	F	17	Pré-natal
8	IDF	M	57	Alcólatra crônico, anemia, emagrecimento
9	VLS	M	24	Diarréia e vômitos
10	JFC	M	47	Alcólatra crônico, astenia e anemia
11	CBG	M	26	Cefaléia, diarréia, astenia e tosse seca
12	SMB	F	18	Pré-natal
13	VDS	F	38	Pré-natal
14	SSB	F	14	Diarréia
15	HLS	M	34	Epigastria
16	ACV	M	48	Epigastria
17	MEG	F	18	Cefaléia
18	JES	F	24	Pré-natal
19	ABB	M	41	Diarréia
20	UCP	M	52	Dor lombar em cólica
21	LAN	M	26	Assintomático
22	GFS	M	60	Dor abdominal e diarréia
23	IFS	F	48	Dor abdominal e inapetência
24	MSA	F	4	Dor abdominal
25	LCRV	F	5	Epigastria
26	BPB	F	4	Palidez e astenia
27	AMM	M	18	Diarréia
28	VOO	M	33	Dispneia
29	TRL	F	34	Pré-natal
30	MFS	M	55	Epigastria e anemia
31	JSA	M	57	Dor abdominal
32	SAM	M	80	Sintomas dispépticos
33	JAS	M	41	Diarréia esporádica
34	LRS	F	10	Astenia
35	MSC	F	26	Pré-natal
36	MMO	M	50	Diarréia e epigastria
37	CR	M	20	Assintomático
38	EPC	M	46	Epigastria
39	LSM	F	17	Pré-natal
40	JAS	M	73	Dor abdominal
41	SP	F	19	Epigastria
42	CH	F	29	Pré-natal
43	LEM	F	47	Astenia e diarréia
44	EVCA	F	31	Epigastria
45	AFC	M	40	Dor abdominal
46	DGF	F	39	P ^{cte} renal crônica
47	NPS	M	14	Anemia
48	DF	F	38	Pré-natal
49	MCFC	F	25	Diarréia e dor abdominal
50	RGB	M	33	Diarréia e dor abdominal
51	JLB	M	44	Epigastria
52	ESS	M	37	Sintomas dispépticos
53	LPRO	F	61	Emagrecimento e polifagia
54	GGR	M	24	Assintomático
55	CRA	F	39	Epigastria
56	RAM	M	57	Eritoderma esfoliativo e prurido
57	VPB	F	46	Anemia macrocítica
58	DFS	F	41	Dor abdominal
59	MALM	F	25	Pré-natal
60	DAT	F	09	Dor abdominal e prurido
61	DV	F	69	Assintomática

Tabela 6 - Resultados laboratoriais dos 61 casos de estrogiloidíase.

Caso	MIFC para outros parasitas	eosinofilia (%)	outras infecções	IF.I. -IgG	ELISA -IgG	<i>S. ratti</i>
				<i>S. ratti</i>	SALINO	ALCALINO
1	negativo	2	---	160	80	160
2	<i>E. hartmanni</i>	12	---	160	160	80
3	negativo	18	---	80	80	160
4	negativo	23	Toxoplasmose	80	80	40
5	<i>E. coli</i> ; <i>E. histolytica</i>	13	---	80	160	160
6	<i>S. mansoni</i>	NR	---	80	80	160
7	negativo	5	Toxoplasmose	40	20	negativo.
8	negativo	4	---	40	80	80
9	negativo	30	---	160	160	320
10	negativo	2	---	40	160	160
11	<i>E. coli</i> / <i>E. histolytica</i>	12	---	160	160	320
12	<i>E. histolytica</i>	9	Toxoplasmose	160	320	320
13	negativo	8	---	20	20	160
14	negativo	NR	---	20	negativo	20
15	negativo	10	---	160	80	80
16	negativo	8	D. de Chagas	20	20	80
17	negativo	4	---	negativo	80	80
18	negativo	18	Toxoplasmose	160	160	160
19	negativo	7	---	80	80	80
20	<i>H. nana</i>	NR	---	160	160	160
21	negativo	15	---	80	80	160
22	negativo	8	---	160	80	320
23	<i>E. coli</i>	8	Neurocisticercose	80	80	80
24	<i>G. lamblia</i>	1	---	640	160	320
25	negativo	4	---	negativo	80	80
26	negativo	1	---	negativo	40	40
27	<i>E. coli</i>	18	---	160	160	320
28	negativo	2	---	80	160	160
29	<i>E. coli</i> / <i>E. histolytica</i>	3	---	20	80	80
30	negativo	5	---	80	160	160
31	negativo	2	Esquistossomose	40	160	160
32	<i>E. hartmanni</i>	23	---	320	320	160
33	negativo	6	---	160	80	160
34	<i>G. lamblia</i>	16	---	2640	320	320
35	negativo	NR	---	1280	320	640
36	negativo	3	Esquistossomose	negativo	80	80
37	negativo	4	---	320	160	320
38	negativo	NR	D. de Chagas	20	80	80
39	negativo	4	Rubéola	2640	80	160
40	negativo	10	---	640	40	160
41	negativo	14	---	1280	320	320
42	negativo	3	Toxoplasmose	320	160	320
43	negativo	3	---	160	160	160
44	negativo	6	---	80	80	80
45	<i>E. coli</i> / <i>E. histolytica</i>	14	---	640	40	80
46	<i>E. coli</i>	2	Toxoplasmose	160	160	160
47	negativo	2	---	40	80	80
48	<i>G. lamblia</i>	1	Toxoplasmose	20	80	80
49	negativo	3	---	20	80	80
50	negativo	9	---	640	160	160
51	<i>E. coli</i> / <i>E. histolytica</i>	NR	---	160	80	80
52	negativo	4	---	80	160	160
53	negativo	3	---	160	320	320
54	negativo	10	---	80	80	80
55	negativo	1	---	40	20	80
56	negativo	1	---	160	80	80
57	negativo	28	---	80	320	320
58	negativo	12	---	40	80	160
59	negativo	11	---	80	80	80
60	negativo	NR	---	160	320	320
61	negativo	4	---	160	80	160

MIFC= Método de Exames de Fezes IF= Teste de imunofluorescência indireta NR= Não Realizado
 "cut off" para I.F.I. e ELISA foram considerados nos títulos de 20 e 80, respectivamente.

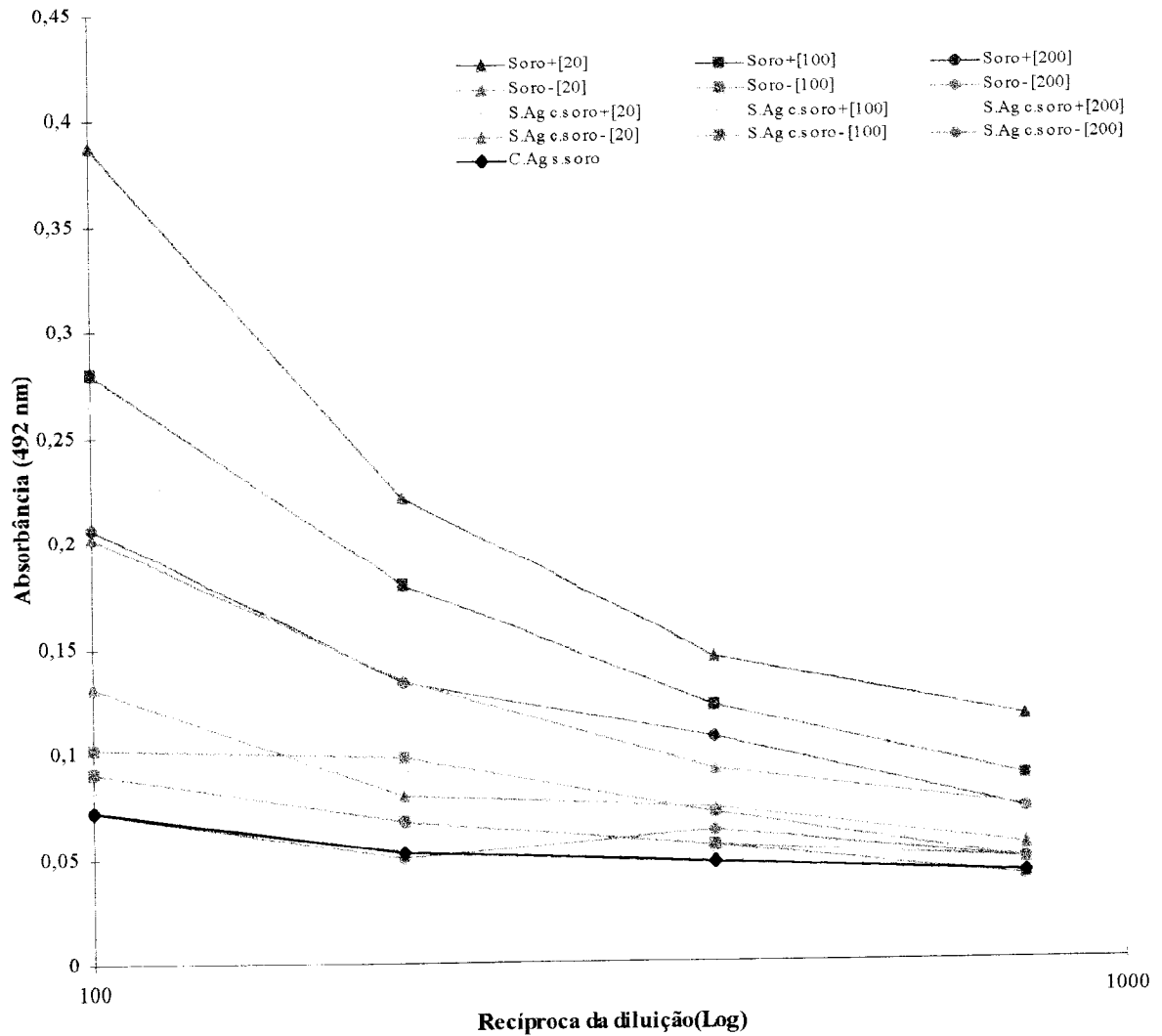


Figura 1 - Curvas de reatividade logarítmica do Teste ELISA utilizando extrato salino de *Strongyloides ratti* na concentração de $10\mu\text{g/ml}$, frente a soros padrões positivo e negativo (1/20, 1/100, 1/200,) e controles do diluente empregando-se o conjugado de coelho anti-IgG Humana peroxidase nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. As letras S(s), Ag e C(c) significam sem, com e antígeno, respectivamente. (*Os valores de Soro-[200] apresentou o mesmo resultado que S.Ag c.soro-[100].)

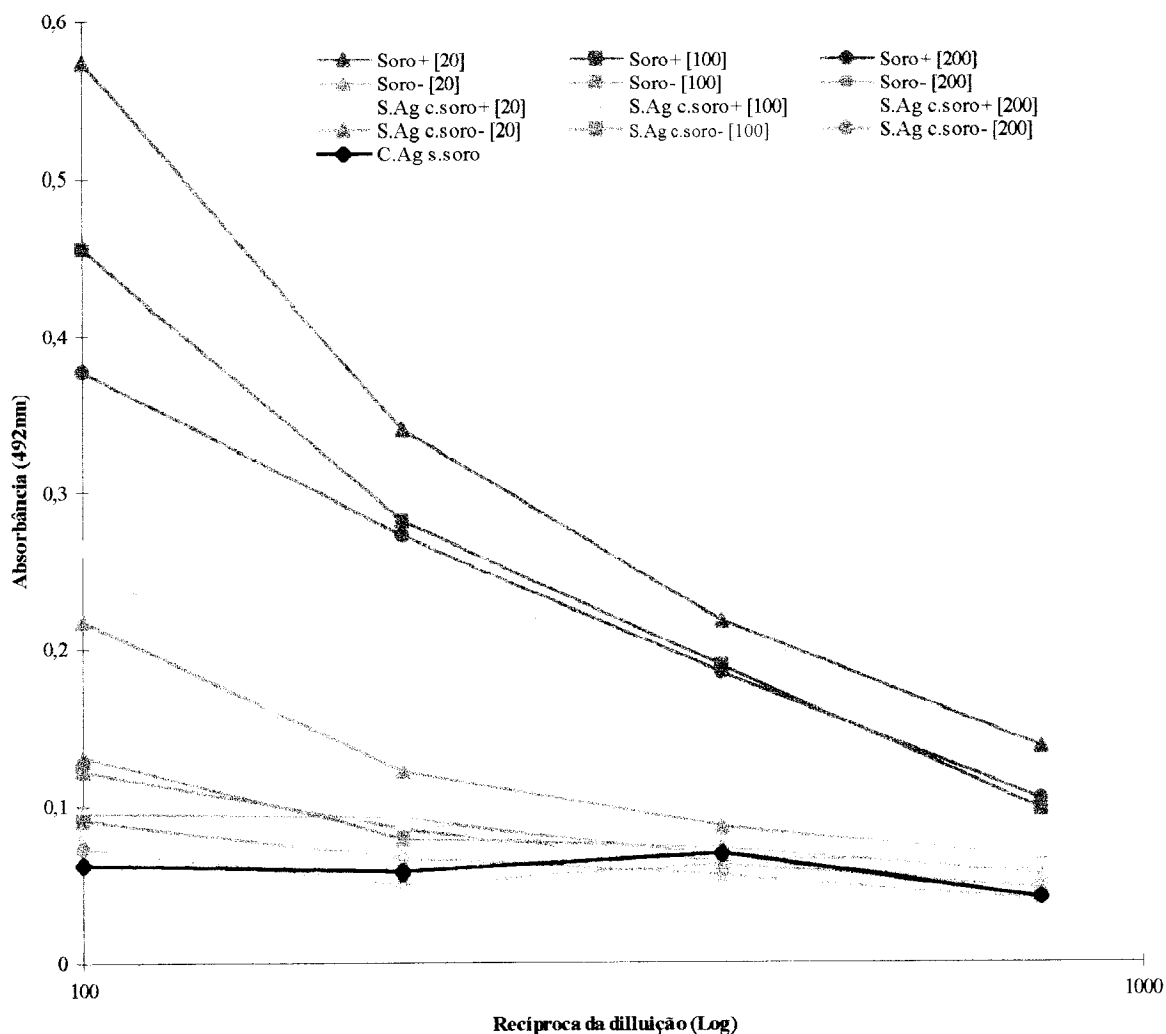


Fig.2 - Curvas de reatividade logarítmica do Teste ELISA utilizando extrato Alcalino de *Strongyloides ratti* na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, frente a soros padrões positivo e negativo (1/20, 1/100 e 1/200) e controles de diluente empregando-se o conjugado de coelho anti-IgG Humana peroxidase nas diluições 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. As letras S(s), Ag e C(c) significam sem, com e antígeno, respectivamente.

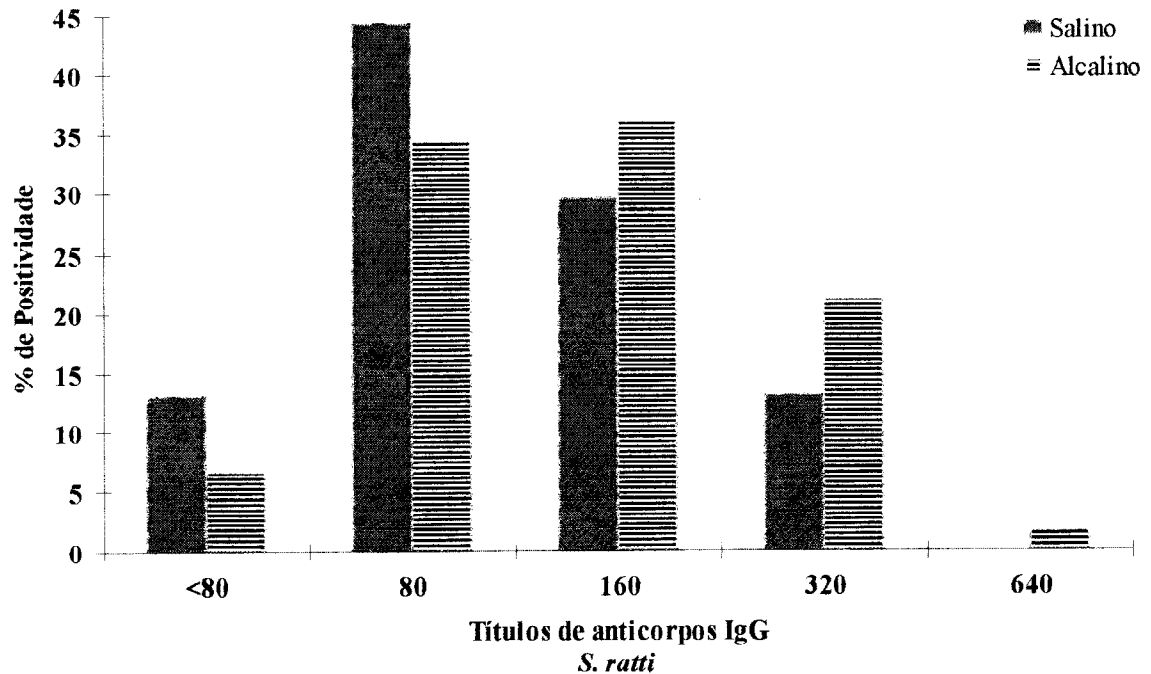


Fig. 3 - Frequência de positividade dos títulos de anticorpos IgG detectados pelo teste imunoenzimática ELISA frente aos extratos salino e alcalino de *S. ratti* em 61 soros de pacientes com estrogiloidíase.

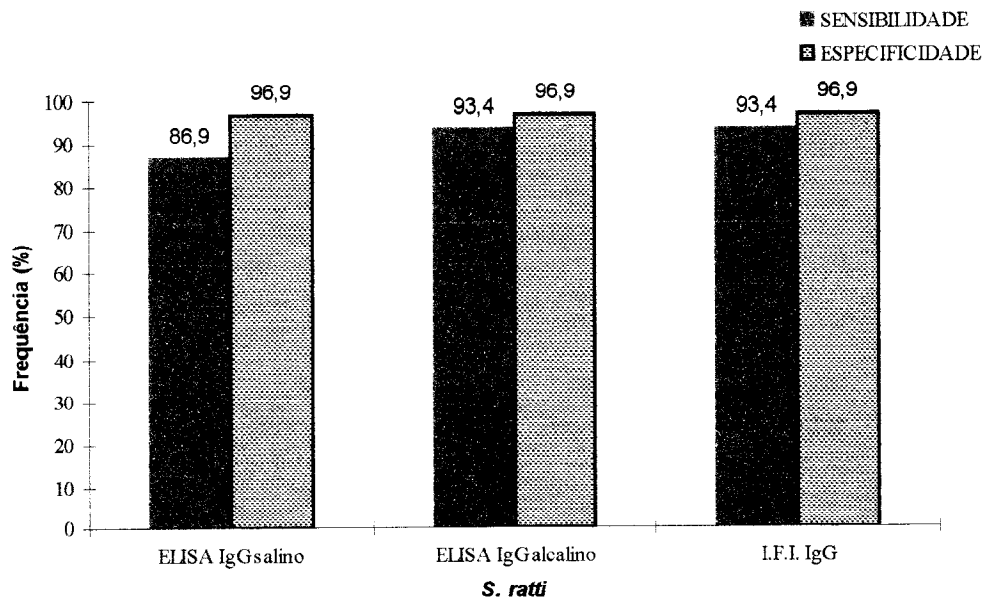


Fig 4 - Comparação entre a frequência de sensibilidade e especificidade do teste imunoenzimático ELISA-IgG frente aos dois extratos salino e extrato alcalino e o teste de imunofluorescência indireta-IgG (I.F.I.) para *S. ratti*.

5 - DISCUSSÃO

Para o diagnóstico imunológico da estrogiloidíase humana foi padronizado a teste ELISA-IgG frente aos extratos salino e alcalino de *S. ratti* com alta sensibilidade e especificidade para ambos os antígenos utilizados.

A sensibilidade e a especificidade de uma técnica imunológica dependem, em grande parte, da preparação antigênica utilizada (ROSSI *et al.*, 1993a). O emprego do antígeno heterólogo (*S. ratti*) possibilitou a produção de dois extratos antigênicos, visto que a obtenção de larvas de *S. stercoralis* era um fator limitante para o desenvolvimento de testes mais sensíveis (COSTA-CRUZ *et al.* 1997).

Dos dois extratos antigênicos, o alcalino apresentou maior rendimento na dosagem de proteínas em relação à quantidade de larvas utilizadas e menor gasto de tempo no seu preparo (item 3.2). Não havendo diferença significativa nas sensibilidades e especificidades entre os extratos, no teste ELISA, esses fatos foram de importância para a escolha do extrato alcalino, o qual futuramente poderá ser utilizado em estudos individuais ou epidemiológicos da estrogiloidíase humana.

O Quadro 1 demonstra que até o momento o teste ELISA foi realizado somente em extrato salino de diversos parasitos para a detecção de diferentes

classes de imunoglobulinas nos soros humanos de indivíduos infectados pelo *S. stercoralis* sendo, portanto, a padronização do extrato alcalino um trabalho pioneiro como apoio laboratorial para o diagnóstico da estrogiloidíase humana.

A utilização do extrato salino de *S. stercoralis* e *S. ratti* foi descrito no teste ELISA-IgG (“cut off” maior ou igual a oito), obtendo para ambos antígenos respectivamente sensibilidades de 82,0% e 84,0% (NEVA, GAM, BURKE, 1981) e 83,8% e 80,8% (GAM, NEVA KROSTOSKI, 1987). As especificidades não foram descritas para o primeiro trabalho, porém para o segundo foram de 90,2% e 83,9%. Estes trabalhos prévios com *S. ratti* são de origem estrangeira indicando que o presente estudo é o primeiro no Brasil a utilizar antígeno heterólogo com extrato salino.

A maioria dos trabalhos realizados indica que a sensibilidade das técnicas imunoenzimáticas para detecção de anticorpos específicos da classe IgG anti-*S. stercoralis* variou de 80,0% a 100% e a do *S. ratti* variou de 80,8% a 84,0% (Quadro 1). A sensibilidade (86,9%) obtida neste estudo considerando “cut off” maior ou superior a 80 para o extrato salino de *S. ratti* foi superior aos resultados de NEVA, GAM, BURKE (1981) de 84,0% e GAM, NEVA, KROSTOSKI (1987) 80,8% ambos considerando “cut off” maior ou superior a oito.

No Brasil foram realizados dois trabalhos com extrato salino de *S. stercoralis* em soros de indivíduos com estrogiloidíase e soros de indivíduos controles. As sensibilidades obtidas por BRASIL *et al.* (1988) e ROSSI *et al.* (1993b) foram respectivamente, de 92,0% e 85,2%. Considerando o extrato salino do antígeno heterólogo foi obtida sensibilidade superior ao de ROSSI *et al.* (1993b) e inferior ao de BRASIL *et al.* (1988), porém com especificidade superior ao mesmo.

Em 1993, CONWAY *et al.* descreveram dois trabalhos utilizando extrato salino para detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* com um limite de

positividade igual ou superior a 200. No primeiro (CONWAY *et al.* 1993a) foram feitas várias pré-absorções para diminuir as reações cruzadas com outros helmintos obtendo-se sensibilidade de 100% e especificidade de 58% para o extrato salino sem pré-absorção, enquanto que no segundo (CONWAY *et al.* 1993b) foi de 91% para sensibilidade e 70,4% para a especificidade associando ao Western blot, demonstrando uma preocupação com as reações cruzadas com ancilostomídeos, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*.

As reações cruzadas observadas no nosso estudo (dois casos) eram de pacientes com ancilostomíase, situação já demonstrada por BRASIL *et al.* (1988), CONWAY *et al.* (1993) e LINDO *et al.* (1994). O outro caso de reação cruzada foi de infecção por *Enterobius vermicularis* diagnosticado em uma paciente do sexo feminino de 23 anos de idade em período gestacional não sendo possível a confirmação parasitológica da presença do *S. stercoralis* ou de ancilostomídeo, porém salienta-se que os três testes imunológicos para estrogiloidíase foram reagentes no título 80.

Não houve diferença significativa na sensibilidade e especificidade entre as reações dos dois extratos frente ao antígeno *S. ratti*, isto demonstra que ambos apresentam possibilidade de serem utilizados no teste ELISA. O teste I.F.I. *S. ratti* (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997) pode ser associado ao teste ELISA *S. ratti* com eficácia para o diagnóstico da estrogiloidíase humana, pois a sensibilidade e a especificidade do extrato alcalino foram iguais a do teste I.F.I. .

No presente trabalho, o teste ELISA não detectou anticorpos em oito pacientes para o extrato salino e em quatro pacientes para o extrato alcalino com diagnóstico comprovado de estrogiloidíase, o que poderia ser atribuída a estes indivíduos estarem na forma aguda, confirmada pela eliminação de larvas nas fezes. Destes, três (casos 7, 14, 26) foram negativos para os dois extratos. Os casos 13, 16, 40, 45 e 55 mostraram-se negativos apenas para o extrato salino e

o caso 4 somente para o extrato alcalino. O caso 26 era uma criança com idade de cinco anos de idade, e é provável que este paciente apresentasse uma imaturidade na resposta imunológica específica contra antígenos de *S. stercoralis*.

Salienta-se a importância da associação de dois testes imunológicos, onde um detecta anticorpos frente a extratos solúveis (ELISA) e outro frente a antígenos de superfície (I.F.I.) para o estabelecimento da soroprevalência para estrogiloidíase humana.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- Padronizou-se pela primeira vez no Brasil o teste ELISA-IgG com antígeno heterólogo (*S. ratti*) para ao diagnóstico da estrogiloidíase humana.
- A sensibilidade do teste ELISA-IgG em relação aos soros variou com os extratos utilizados, sendo o extrato alcalino mais sensível porém de igual valor ao teste de Imunofluorescência Indireta-IgG.
- A especificidade do teste ELISA-IgG em soros foi igual para os dois extratos antigênicos e iguais ao teste de Imunofluorescência Indireta-IgG.
- Em relação à praticidade de preparo e rendimento obtido o extrato alcalino foi superior ao extrato salino de *S. ratti*.
- O teste imunoenzimático ELISA com extrato alcalino é recomendado, como alternativa diagnóstica por não apresentar diferença significativa em relação ao extrato salino.
- A associação dos testes ELISA e I.F.I. de *S. ratti* constituem métodos eficazes para o estabelecimento da soroprevalência para estrogiloidíase humana.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDRADE NETO, J.L. de, ASSEF, M.C.V. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Eds.). **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 1803p. p.1373-1378.

ARAKAKI, T. *et al.* Efficacy of plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.76, p.425-428, 1990.

ASSEFA, T. *et al.* Evaluation of the Baermann's method in the laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **Ethiop. Med. J.**, v.29, p.193-198, 1991.

AVRAM, E. *et al.* Cytologic detection of *Enterobius vermicularis* and *Strongyloides stercoralis* in routine cervicovaginal smears and urocytograms. **Acta. Cytol.**, (Baltimore), v.28, p.468-470, 1984.

*Segundo Norma da ABNT NBR 6023/1989 (referência bibliográfica) e NBR 6023 e 060 (abreviatura).

BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoben. Mededeel. nnith. in. Geneesk. **Lab. Weltrewe Feestbundel Batavia**, p.41-47, 1917.

BARNISH, G., ASHFORD, R.W. *Strongyloides fulleborni* in Papua New Guinea: epidemiology in an isolated community and results of an intervention study. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.83, p.499-506, 1989.

BEAL, C.B., VIENS, , GRANT, . A new technique for sampling duodenal contents: demonstration of upper small bowel pathogens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.19, p.349-352, 1970.

BRASIL, R. *et al.* Diagnóstico sorológico da estromgiloidíase humana pelo método imunoenzimático ELISA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.21, p.139-143, 1988.

BRASITUS, T.A. *et al.* Intestinal strongyloidiasis. A case report and review of the literature. **Am. J. Gastroenterol. Latinoam.**, v.73, p.65-69, 1980.

BOUREE, P. *et al.* Anguillulose: analyse clinique biologique et epidemiologique de 350 observation. **Nouv. Presse Med.**, v.10, p.679-681, 1981.

BULLAMAH, C.B., COSTA-CRUZ, J.M. Diagnóstico imunológico de estromgiloidíase humana, através do teste de imunofluorescência indireta empregando atígeno de *Strongyloides stercoralis*. **IN: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 6, 1995, Campo Grande, MS, Anais..., p.106.

- CAMPOS, D.M.B. *et al.* Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico de estrogiloidíase humana. **Rev. Patol. Trop.**, v.17, p.17-23, 1988.
- CHAVES-BORGES, F.A., MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55pp..
- CHEN, J.J. *et al.* Duodenal *Strongyloides stercoralis* infection. **Endoscopy**, v.26, p.272, 1994.
- CONWAY, D.J. *et al.* Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.87, p.173-176, 1993a.
- CONWAY, D.J. *et al.* Serum IgG reactivity with 41-,31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **J. Infect. Dis.**, v.168, p.784-787, 1993b.
- CONWAY, D.J. *et al.* Towards effective control of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitol. Today**, v.11, p.420-423, 1995.
- COSTA-CRUZ, J.M. *et al.* Cryo-microtome cuts of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.39, p.313-317, 1997.

COUDERT, J. *et al.* Diagnostic serologique de Panguillulose humaine par immunofluorescence (results preliminaires) **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.61, p.74-80, 1968.

CUTTI, E., ELOY, A. **Strongyloidiasis en Santa Clotilde (Rio Napo): uso de Baermann modificado en copa para heces y esputo.** UPCH Faculdade de Medicina Alberto Hurtado, p.49, 1992, 49p. (Tese, Doutorado).

DAFFALA, A.A. The indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis of strongyloidiasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.75, p.109-111, 1972.

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

DREYER, G. *et al.* Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens – Implications for diagnosis and clinical trials. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.2568-2571, 1996.

FERREIRA, M.S. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCACCIA, R., DIETZE, R. (Eds.). **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.856-865.

FERREIRA, M.S. *et al.* Estrongiloidíase em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA): Estudo de 24 casos. IN: **CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA**, 9, 1996, Recife, PE, Anais..., p.93.

- GAM, A.A., NEVA, F.A., KROTOSKI, W.A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.37, p.157-161, 1987.
- GELBER, M., RODRIG, J. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **Harefuah.**, v.130, p.190-192, 1996.
- GENTA, R.M. Strongyloidiasis in US veterans of the Vietna and others wars. **JAMA**, v.258, p.49-52, 1987.
- GENTA, R.M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v.89, p.391-394, 1988.
- GENTA, R.M. Global soroprevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated diasease. **Rev. Infect. Dis.**, v.2, p.755-767, 1989.
- GENTA, R.M., WEIL, G.J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Lab. Invest.**, v.47, p.87-90, 1982.
- GENTA, R.M., DOUCE, R.W., WALZER, P.D. Diagnostic implications of parasite-specific immune responses in immunocompromised patients with strongyloidiasis. **J. Clin. Microb.**, v.23, p.1099-1103, 1986.
- GILL, G.V., BELL, D.R., FIFIELD, R. Lack of immunoglobulin E response to ongstanding strongylidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.37, p.292-294, 1979.

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

GROVE, D.I., BLAIR, A.J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides stercoralis* larvae. **Am. J. Trop. Hyg.**, v.30, p.344-348, 1981.

HOFFMANN, W.A., PONS, J.A., JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico, **J. Publ. Health. Trop. Med.**, v.9, p.283-291, 1934.

HUARATO SEDDA, M. *et al.* Study of *Strongyloides stercoralis* in the duodenal juice obtained by the examination of a string capsule or the Enterotest. **Rev. Gastroenterol.**, v.10, p.107-110, 1990.

IGLÉSIAS, J.D.F. **Aspectos médicos das parasitoses humanas**, Rio de Janeiro: MEDSI, 1997. pp.1-483, p.282-290.

JONES, C.A., ABADIE, S.H. Studies in human strongyloidiasis: a comparison of the efficiency of diagnosis by examination of feces and duodenal fluid. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.24, p. 1154, 1954.

KOGA, K. *et al.* A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.518-521, 1991.

KOGA, K. *et al.* How effective is the agar plate method for *Strongyloides stercoralis*?. **J. Parasitol.**, v.78, p.155-156, 1992.

- LEÃO, R.C., TOLEDO BARROS, M.M., MENDES, E. Immunological study of human strongyloidiasis I: analysis of IgE levels. **Allergol. Immunopathol.**, v.8, p.31-34, 1980.
- LEVINE, N.D. **Nematode parasites of domestic animals and of man.** 2. ed. Minneapolis: Burges, 1979.
- LINDO, J.E. *et al.* Prospective evaluation of ELISA and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.51, p.175-179, 1994.
- LOWRY, V.H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.29, p.265-275, 1951.
- LUTZ, A.V. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.11, p.121-125, 1919.
- MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, p.161-164, 1998.
- MALE, D., STEWARD, M. Técnicas imunológicas. IN: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (Eds.). **Imunologia**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. p.28.6.
- McRURY, J. *et al.* Specific IgE response in human strongyloidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.65, p.631-638, 1986.

- MELTZER, R.S.I. *et al.* Case report: Antmorten diagnosis of central nervous system strongyloidiasis. **Am. J. Med. Sci.**, v.277, p.91-98, 1979.
- MESSIAS, I.T. *et al.* Clinical, immunological and epidemiological aspects of strongyloidiasis in endemic area of Brazil. **Allergol. Immunopathol.**, v.15, p.37-41, 1987.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Rev. Serv. Esp. Saúde Pública.**, v.1, p.507-524, 1948.
- MURTY, D.A. *et al.* Cytologic detection of *Strongyloides stercoralis* in a routine cervicovaginal smear. Case report. **Acta Cytol.**, v.39, p.223-225, 1994.
- NEVA, F.A., GAM, A.A., BURKE, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. **J. Infect. Dis.**, v.144, p.427-432, 1981.
- NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia humana** 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995, 524p. Cap.52 Exame parasitológico de fezes, p.485-495.
- PELLEGRINO, J., CHAIA, G., POMPEU MEMORIA, J.M. Observações sobre reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* em pacientes com estrogiloidíase. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.3, p.181-186, 1961.
- PEREIRA-LIMA, J., DELGADO, P.G. Diagnosis of strongyloidiasis: importance of Baermann's method. **Am. J. Diag. Dis.**, v.6, p.899-904, 1961.

PESSOA, S.B., MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PIRES, M.L., DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v.48, p.175-182, 1993.

ROSSI, C.L. *et al.* Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.26, p.83-87, 1993a.

ROSSI, C.L. *et al.* Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.35, p.361-365, 1993b.

SALAZAR, D. A. *et al.* Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.141-145, 1995.

SANTOS, J. I., PADILHA FILHO, O. Baixa sensibilidade do método de cultura de larvas (Harada-Mori) no diagnóstico de estrogiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, p.51-52, 1996.

SATO, Y. *et al.* Intradermal reações in strongyloidiasis. **Inter. J. Parasitol.**, v.16, p.87-91, 1986.

SATO, Y. *et al.* Gelatin particule indirect agglutination test for examination for strongyloidiasis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.85, p.515-518, 1991.

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

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

SPIEGEL, M.R. **Estatística**. São Paulo: Mcgraw-Hill, 1993.

SCOWDEN, E.B., SCHAFFNER, W., STONE, W.J. Overwhelming strongyloidiasis: an unappreciated opportunistic infection. **Medicine** (Baltimore), v.57, p.527-544, 1978.

SOULSBY, E.J.L. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. **Immunol. Letters**, v.16, p.315, 1987.

STUERCHLER, D. **Endemiegebiete tropischer infektionskrankheiten**. Bern, Hans. Huber, 1981.

SUKHAVAT, K. *et al.* Comparative efficacy of four methods for the detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool specimens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.88, p.95-96, 1994.

TAKAYANAGUI, O.M. *et al.* Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Neurol.**, v.45, p.193-194, 1995.

TARANTO, N.J. *Strongyloides stercoralis* report case and review of the literature. **Acta Gastroenterol. Latinoam.**, v.25, p.113-120, 1995.

WILSON, M.B., NAKANE, P.K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. IN: KNAPP, K.HOLUBAR, WICH, G. (eds.): **Immunofluorescence and related techniques** North-Holland Biomedical, Amsterdam, p.215, 1978.

YASSIN, S.M.A., GARRET, M. Parasites in cytodiagnosis: a case report of *Strongyloides stercoralis* papanicolaou smears of gastric aspirate, with a review of the literature. **Acta Cytol.**, v.24, p.539-544, 1980.

8 - ANEXO

Termo de Consentimento

Eu _____ Doc. n° _____
consinto na realização da coleta de meu material fecal e soro necessários à
padronização de testes imunológicos no diagnóstico da estrogiloidíase humana
na Universidade Federal de Uberlândia, sob a coordenação da Prof^a Dr^a Julia
Maria Costa Cruz.

Assinatura do responsável

Uberlândia, ____ de _____ de 199__.