

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELISA – IgG, IgG1 e IgG4 Séricas Específicas no Diagnóstico da  
Estrongiloidíase Humana

Maria Cecília de Oliveira

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

Fevereiro - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELISA – IgG, IgG1 e IgG4 Séricas Específicas no Diagnóstico da  
Estrongiloidíase Humana

Maria Cecília de Oliveira

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Julia Maria Costa-Cruz

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  
Fevereiro - 2003

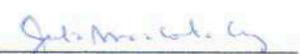
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELISA – IgG, IgG1 e IgG4 Séricas Específicas no Diagnóstico da  
Estrongiloidíase Humana

Maria Cecília de Oliveira

Aprovada pela banca examinadora em 26/09/2003

Nota 100

  
Profª Drª Julia Maria Costa-Cruz  
Orientadora

  
Msa Rosângela Maria Rodrigues  
Co-orientadora

  
Drª Neide Maria da Silva

Uberlândia – MG  
Fevereiro -2003

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me dado sabedoria e paciência para enfrentar os obstáculos que muitas vezes foram difíceis, porém não intransponíveis.

Agradeço aos meus familiares que sempre me apoiaram e me insentivaram nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Julia Maria Costa-Cruz, pelo carinho, paciência e atenção com que sempre me tratou.

À minha co-orientadora Msa. Rosângela Maria Rodrigues pela dedicação, amizade e disponibilidade durante todo o trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Neide Maria da Silva por aceitar meu convite para fazer parte de minha banca.

À Deise Aparecida de Oliveira Silva pela atenção e auxílio durante esta pesquisa.

À Mônica por sua ajuda com as análises estatísticas, que foram de fundamental importância para conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia: Cláudio, Gleyce, Heliana, Idessânia e Margarida, que muito contribuíram e ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, em especial: Maria do Rosário, Maria das Graças, Ivanildes Solange e Geraldo pela amizade e auxílio durante o trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**n** = Número haplóide de gametas

**L** = Referente ao estágio de desenvolvimento larval

**cm** = Centímetro

**MIFC** = Mertiolato (ou mercúrio) iodo formol conservante

**“cut-off”** = limiar de reatividade da reação

**ELISA** = “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

**LCR** = Líquido cefalorraquidiano

**IgG** = Imunoglobulina G

**IgG1 e IgG4** = Subclasses da imunoglobulina G

**IgM** = Imunoglobulina M

**IgA** = Imunoglobulina A

**IgE** = Imunoglobulina E

**WB** = *Western blotting*

**KDa** = Quilodaltons

**μL** = Microlitros

**mL** = Mililitros

**rpm** = Rotações por minuto

**Khz** = Quilohertz

**HC** = Hospital de clínicas

**IFI** = Imunofluorescência Indireta

**M** = Molaridade

**N** = Normalidade

**OPD** = Solução cromógena de ortofenilenodiamina

**PBS** = Solução salina tamponada com fosfato

**PBS-T** = Solução salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20 a 0,05%

**pH** = Potencial hidrogeniônico

**mg** = miligramas

**IE** = Índice ELISA

## RESUMO

O parasito *Strongyloides stercoralis* é responsável por infecções assintomáticas ou oligossintomáticas no trato gastro intestinal do homem. Este estudo teve como objetivo detectar os níveis de IgG e subclasses (IgG1 e IgG4) em amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase, por ELISA, utilizando extrato salino de *Strongyloides ratti*, analisou-se 100 amostras de soros, 40 de pacientes com estrongiloidíase (Grupo I), 30 pacientes com outros parasitos intestinais (Grupo II) e 30 indivíduos saudáveis (Grupo III). Níveis de IgG anti-*Strongyloides* do grupo I foram significativamente maiores que nos grupo II ( $p = 0,0004$ ) e III ( $p < 0,0001$ ). Níveis de IgG1 do grupo I tiveram diferença significativa entre os grupos II ( $p < 0,0001$ ) e III ( $p < 0,0001$ ). Para a IgG4, o grupo I apresentou diferença significativa em relação ao II ( $p = 0,0003$ ) e III ( $p < 0,0001$ ). Houve correlação entre IgG e IgG1 ( $r = 0,7990$ ;  $p < 0,0001$ ), correlação entre IgG e IgG4 ( $r = 0,5444$ ;  $p = 0,0003$ ) e entre IgG1 e IgG4 ( $r = 0,4942$ ;  $p = 0,0012$ ). A utilização das subclasses IgG (IgG1 e IgG4) é útil no auxílio do diagnóstico da estrongiloidíase humana.

**Palavras-chave:** *Strongyloides stercoralis*, imunodiagnóstico, imunoglobulinas.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	1
1.1- Diagnósticos Parasitológicos ou Diretos	4
1.2 - Diagnósticos Indiretos	5
<b>2 - OBJETIVOS</b>	8
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	9
3.1 - Seleção dos Pacientes e dos Indivíduos Controle	9
3.2 - Obtenção de Antígeno Heterólogo de Larvas de <i>Strongyloides ratti</i>	11
3.3 - Método de Looss	11
3.4 - Método de Baermann-Moraes para Obtenção de Larvas	12
3.5 - Produção do Extrato Salino de <i>S. ratti</i>	12
3.6 - Diagnóstico Parasitológico de Fezes	13
3.6.1 - Amostras Fecais	13
3.6.2 - Método de Baermann-Moraes	13
3.6.3 - Método de Hoffman, Pons e Janer (Hoffman, Pons e Janer, 1934)	13
3.7 - Diagnósticos Imunológicos	14
3.7.1 - Teste ELISA para Detecção de IgG	14
3.7.2 - Teste ELISA para Detecção de IgG1 e IgG4 Específicas anti- <i>Strongyloides stercoralis</i>	15
3.8 - Análise Estatística	16
3.9 - Normas de Biossegurança	16
<b>4 - RESULTADOS</b>	18
4.1 - Caracterização dos Grupos Estudados Quanto a sexo e Idade	18
4.2 - Obtenção do Antígeno Heterólogo de larvas de <i>S. ratti</i>	19
4.3 - Detecção de Anticorpos IgG e Subclasses IgG1 e IgG4 anti- <i>Strongyloides</i> pelo Teste ELISA	19
4.4 - Positividade do Teste ELISA na Detecção de IgG e Subclasses IgG1 e IgG4 anti- <i>Strongyloides</i>	23
4.5 - Correlação Entre os Níveis de Anticorpos IgG e Subclasses IgG1 e IgG4 Específicas anti - <i>Strongyloides</i>	24
<b>5 - DISCUSSÃO</b>	26
<b>6 - CONCLUSÕES</b>	30
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	31

## 1- INTRODUÇÃO

O parasito *Strongyloides stercoralis* pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, subclasse Rhabditia, ordem Rhabditida. A família Strongyloididae é composta por apenas um gênero, *Strongyloides*, neste gênero estão incluídas 52 espécies, sendo que duas têm importância em saúde pública: *Strongyloides stercoralis* e *S. fuelleborni*, e uma subespécie *S. fuelleborni kelly* (LEVINE, 1979). A primeira tem distribuição mundial, a segunda é encontrada na África e nas Filipinas e a terceira apenas na Ilha de Nova Guiné (PIRES; DREYER, 1993).

A espécie *S. stercoralis* foi descoberta, em 1876, por Normand, na cidade de Toulon – França, ao examinar fezes diarréicas de soldados procedentes da Cochinchina, atual Vietnã. As formas do parasito foram descritas por Bavay, em 1876, como *Anguillula stercoralis* para os parasitos encontrados na luz intestinal e como *Anguillula intestinalis* para os obtidos de necropsia. Leuckart em 1911 demonstrou serem as formas estercorales e intestinalis pertencentes à mesma espécie heterogenética, a fêmea partenogenética e outra

de geração de vida livre bissexuada, passando a denomina-la *Strongyloides stercoralis* (PÊSSOA; MARTINS, 1982).

A estrogiloidíase apresenta distribuição mundial, tendo maior prevalência em áreas tropicais e subtropicais (GENTA; LILLIBRIDGE, 1989; KOBAYASHI *et al.*, 1996; COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998; PAULA *et al.*, 2000).

Uberlândia é considerada uma região hiperendêmica para a estrogiloidíase (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998), pois através dos métodos parasitológicos, Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e Lutz (LUTZ, 1919), obtiveram 13% de prevalência de *S. stercoralis* em crianças de 4 meses a 7 anos usuárias de creche.

Este parasito é responsável por infecções assintomáticas ou oligossintomáticas no trato gastrointestinal do homem, o qual pode permanecer infectado por vários anos (SIDDIQUI *et al.*, 1997), mas em indivíduos imunodeprimidos podem ocorrer quadros frequentemente fatais de estrogiloidíase sistêmica ou síndrome de hiperinfecção (ZYGMENT, 1990; ROTTERDAM; TSANG, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; ANANTHAKRISHNAN; NACINI; PANI, 1997; FERREIRA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Fêmeas partenogénicas, em seu habitat normal, localizam-se na parede do intestino delgado, mergulhadas nas criptas da mucosa duodenal, principalmente nas glândulas de Lieberkuhn e na porção superior do jejuno, onde fazem a postura. Nas formas graves da estrogiloidíase podem ser encontradas desde a porção pilórica do estômago até o intestino grosso (COSTA-CRUZ, 2000).

Larvas rãbitóides, eliminadas nas fezes de indivíduos parasitados, podem seguir o ciclo direto ou partenogénico e o ciclo indireto, sexuado ou de vida livre, ambos monoxénicos. Isto ocorre devido à constituição genética das fêmeas partenogénicas, que

são triplóides ( $3n$ ) e podem produzir, simultaneamente, três tipos de ovos, dando origem a três tipos de larvas rhabditóides; triplóides ( $3n$ ), que se transformam em larvas filarióides infectantes, completando o ciclo direto; diplóides ( $2n$ ), que originam fêmeas de vida livre; ou haplóides ( $1n$ ), que evoluem para machos de vida livre, sendo que estes dois últimos tipos de larvas completam o ciclo indireto (PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000).

No ciclo direto, as larvas rhabditóides no solo ou sobre a pele da região perineal, após 24 ou 72 horas se transformam em larvas infectantes (L3). No ciclo indireto, as larvas rhabditóides sofrem quatro mudas no solo e, após 18 ou 24 horas, produzem fêmeas e machos de vida livre. Os ovos originados do acasalamento das formas adultas de vida livre são triplóides, e as larvas rhabditóides evoluem para larvas filarióides ( $3n$ ) infectantes (COSTA-CRUZ, 2000).

Os ciclos direto e indireto se completam pela penetração ativa das larvas na pele ou mucosa oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro. Essas larvas secretam melanoproteases, que auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos, que ocorrem numa velocidade de 10 cm por hora. Algumas morrem no local, mas o ciclo continua através das larvas que atingem a circulação venosa e através destes vasos seguem para o coração e os pulmões. Nos capilares pulmonares transformam-se em L4, atravessam a membrana alveolar e, através de migração pela árvore brônquica, chegam à faringe, podendo ser deglutidas ou expectoradas. Atingindo o intestino delgado transformam-se em fêmeas partenogênicas que depositam seus ovos na mucosa intestinal (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2000).

A contaminação do solo resulta do hábito de defecação neste. Para que as larvas rhabditóides sobrevivam no solo, desenvolvam-se até adultos, machos e fêmeas, de vida livre e se multipliquem, são necessárias algumas condições ambientais: o solo deve ser

arenoso, poroso, rico em matéria orgânica, úmido, com ausência de luz direta. A temperatura ótima varia entre 25 e 30 ° C, a evolução torna-se lenta entre 11 e 19 ° C, e abaixo de 8 ° C as larvas rabditóides tornam-se inviáveis. O clima influencia a prevalência da estrogiloidíase, sendo maior nas áreas tropicais e subtropicais e rara em regiões de clima temperado (REY, 2001).

A infecção no homem ocorre na maioria das vezes, através da penetração ativa das larvas filarióides (L3), as quais não tem preferência por um ou outro ponto do tegumento, ou ocasionalmente, através das mucosas, principalmente da boca e do esôfago (hetero ou primoinfecção). Podendo também ocorrer pelos mecanismos da autoinfecção externa ou exógena e auto-infecção interna ou endógena, sendo que no primeiro as larvas rabditóides presentes na região perineal, transformam-se em larvas filarióides infectantes que aí penetram, completando o ciclo direto. No mecanismo de auto-infecção interna, larvas rabditóides, ainda presentes na luz intestinal (íleo ou cólon) de indivíduos infectados, transformam-se em larvas filarióides. Através desse mecanismo a doença pode manter-se por meses ou anos (FERREIRA, 1991; COSTA-CRUZ, 2000; REY, 2001).

### **1.1– Diagnóstico Parasitológico ou Direto**

O diagnóstico parasitológico torna-se importante, visto que o diagnóstico clínico é dificultado uma vez que aproximadamente 50% dos casos são assintomáticos (COSTA-CRUZ, 2000).

A confirmação parasitológica da presença da infecção pode ser dificultada pelo pequeno número de parasitos, além disto a liberação de larvas nas fezes é mínima e irregular na infecção moderada (cerca de 25 larvas/g de fezes). Nessas circunstâncias, os métodos de rotina utilizados (Lutz ou Hoffmann, Pons e Janer, Ritchie, formol-éter ou

MIFC, Faust ou centrífugo-flutuação) não são adequados. Há necessidade de execução de métodos específicos para pesquisa de larvas que, mesmo analisando repetidas amostras de fezes ou de outros espécimes, apresentam baixa sensibilidade (COSTA-CRUZ, 2000).

## 1.2 – Diagnósticos indiretos

Os métodos de diagnóstico indireto que incluem hemograma, diagnóstico por imagem e métodos imunológicos contribuem para esclarecimento em casos de suspeita clínica da estrogiloidíase. Dentre esses métodos destacam-se os imunológicos, que são úteis na avaliação da resposta imune do hospedeiro nos casos de formas assintomáticas e no esclarecimento do diagnóstico clínico, além da possibilidade de emprego em inquéritos soropidemiológicos por apresentar elevada sensibilidade com relação aos métodos parasitológicos (COSTA-CRUZ, 2000).

Têm sido desenvolvidos diferentes testes imunológicos: a intradermorreação, que sinaliza a resposta imune celular do hospedeiro, foi a reação pioneira, mas não é utilizada na rotina diagnóstica .

A resposta imune-humoral é avaliada pela detecção de anticorpos IgG e subclasses (principalmente IgG4), IgM, IgA e IgE em soro ou, ocasionalmente, em LCR (líquido cefalorraquidiano).

Várias técnicas têm sido descritas, incluindo a aglutinação indireta em partículas de gelatina, hemaglutinação indireta, radioimunoensaio, radioimunoabsorção, reação de imunofluorescência direta em biópsia, imuno-histoquímica, mas sem dúvida a reação de imunofluorescência indireta, utilizando o antígeno larvas filarióides (homólogas ou heterólogas), detectando IgG, IgM ou IgA circulantes, o teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilizando extrato salino e alcalino (homólogo ou

heterólogo) como antígenos na detecção de imunoglobulinas e o teste de *Western blotting* (WB), utilizando extrato salino de *S. stercoralis*, detectando IgG específica principalmente para as frações protéicas de 97, 66, 41, 31 e 28 kDa, têm provado serem eficazes como testes complementares para diagnóstico e monitoramento da resposta imune do paciente (CONWAY *et al.*, 1994; RAMACHANDRAN *et al.*, 1998; COSTA-CRUZ, 2000).

Os modelos experimentais de *S. ratti* e *S. venezuelensis* têm sido utilizados em várias linhas de pesquisas, tais como, no estudo da biologia molecular, interação parasita-hospedeiro, ensaios terapêuticos e fontes de antígenos heterólogos para padronização de novas técnicas no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ, 2000; SIDDIQUI; STANLEY; BERK, 2000).

*S. ratti* (SANDGROUND, 1925) é um parasito de ratos e camundongos. Ele infecta com maior facilidade o rato branco que é mantido em laboratório. A cultura de fezes infectadas permite obtenção de grande número de larvas filarióides, simplificando assim a obtenção do antígeno (ROSSI *et al.*, 1993; COSTA-CRUZ, 2000).

A composição antigênica de *S. ratti* foi comparada com a de *S. stercoralis*, demonstrando-se que esta espécie pode ser utilizada no diagnóstico imunológico em amostras de soro substituindo o antígeno de *S. stercoralis* (GROVE; BLAIR, 1981; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

A IgG constitui a principal imunoglobulina do soro, contribuindo para 70 – 75% do total de imunoglobulinas; as quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) ocorrem aproximadamente, em proporções de 66%, 23%, 7% e 4%, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). A classe IgG, distribuída uniformemente entre os espaços intra e extravasculares é o anticorpo mais importante das respostas imunes secundárias e é a única classe antitoxina (ROITT; BRASTOFF; MALE, 1999).

Alguns estudos têm demonstrado que, utilizando testes ELISA, a IgG é responsável por casos de falso positivo, devido à possibilidade de reações cruzadas com larvas de outros parasitos (GAM; NEVA; KROTOSKI *et al.*, 1987). O método ELISA é considerado como insuficiente para diagnóstico positivo (GENTA, 1986; CONWAY *et al.*, 1993a). O diagnóstico deve ser confirmado por teste eletroforéticos específicos, com proteínas reconhecidas no Western blot (CONWAY *et al.*, 1993b).

Muitos pesquisadores têm atribuído uma atividade protetora às subclasses de IgG, principalmente IgG4, que é produzida como resultado de uma longa exposição antigênica e atua como um fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por IgE. Desta forma, acredita-se que IgG4 poderia neutralizar o antígeno ou bloquear o anticorpo (MORI *et al.*, 2001).

A IgA modula o mecanismo de eliminação das larvas pela diminuição da fecundidade dos vermes e viabilidade dos ovos, enquanto que a IgE regula a auto-infecção e a IgG4 bloqueia a resposta da IgE, tendo um papel principal no estabelecimento e na manutenção de uma estrogiloidíase crônica assintomática. Dessa forma a detecção de IgG4 torna-se uma importante ferramenta no diagnóstico de casos assintomáticos da estrogiloidíase humana (ATKINS *et al.*, 1999).

## **2 - OBJETIVO**

Detectar a presença de IgG e subclasses IgG1 e IgG4 em amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase, pelo método ELISA, utilizando como antígeno o extrato salino de *Strongyloides ratti*.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Seleção dos pacientes e dos indivíduos controle**

Foi obtido um total de 100 amostras de soros a partir da colheita de uma amostra de 10 mL de sangue por punção venosa de pacientes portadores de estrogiloidíase ou com outros parasitos intestinais e de indivíduos saudáveis controles, previamente triados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia. As amostras de soro foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Para colheita do material fecal e do sangue dos pacientes foi assinado um termo de consentimento, no qual, os mesmos e/ou responsáveis, declararam estar cientes dos objetivos do trabalho, bem como da importância de sua colaboração para o mesmo, uma vez que esse

projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Para completar a identificação das amostras de soro, foram anotados dos indivíduos sadios, a sigla dos nomes, a idade, sexo e procedência. Nos casos controles de outros parasitos intestinais e nos casos de estrogiloidíase também foram identificados os sintomas e associações parasitárias ou outras infecções.

Foram obtidas 40 amostras de soros de pacientes com diagnóstico comprovado da parasitose através da identificação de larvas de *S. stercoralis* no material fecal (Grupo I).

Com o objetivo de verificar reatividade cruzada com outras parasitoses nos métodos imunológicos, foram estudadas 30 amostras de soros de pacientes (Grupo II), com outros parasitos intestinais (*G. lamblia*, 9 casos; *A. lumbricoides*, 8 casos; Ancilostomídeos, 4 casos; *Taenia* sp, 3 casos; *E. vermicularis*, 3 casos; *T. trichiura*, 2 casos; *E. histolytica*, 1 caso) triados no HC-UFU ou pelo método de Hoffmann Pons e Janer (1934) no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Contou-se com 30 amostras de soros controles de indivíduos sadios (Grupo III), que em três exames parasitológicos de fezes pelo método Baermann-Moraes e de Hoffmann, Pons e Janer, não foram detectadas larvas de *S. stercoralis* ou outro parasita e negaram história anterior de estrogiloidíase.

Utilizo-se três soros controles positivos de pacientes que estavam eliminando larvas rabditóides de *S. stercoralis* nas fezes.

As amostras de soros padrões negativos foram obtidas de indivíduos sadios assintomáticos, que em exame parasitológico de fezes pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917, MORAES, 1948) e o Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934) foram negativos para *S. stercoralis* ou outros parasitos intestinais e que não apresentaram história anterior de estrogiloidíase.

### 3.2 – Obtenção de antígeno heterólogo de larvas de *S. ratti*

A obtenção de larvas filarióides de *S. ratti* foi realizada utilizando-se fezes de ratos da espécie *Rattus rattus*, mantidos experimentalmente infectados por inoculações via cutânea de 1mL da suspensão contendo 2000 larvas/por rato. Após 10 dias de inoculação, estes animais foram colocados em gaiolas metálicas, forradas com papel umedecido em água, permanecendo por uma noite para defecação.

Posteriormente, foi realizada a colheita das fezes para proceder-se o cultivo pelo método de Looss. Após um período de cinco dias, as larvas foram colhidas pelo método Baermann-Moraes, sendo este material concentrado por centrifugação (350 x g por 15 minutos). A contagem das larvas foi realizada depositando-se 10 µL deste concentrado em três lâminas distintas, sendo em seguida calculada a média entre elas, verificando assim a quantidade de larvas existentes em 1mL.

Parte das larvas obtidas foram utilizadas para manutenção do ciclo evolutivo de *S. ratti* em *R. rattus* e a outra foi mantida à temperatura de -20 ° C para o preparo do extrato antigênico.

### 3.3 - Método de Looss

Para a coprocultura foram misturadas partes iguais de material fecal e carvão vegetal triturados em grãos pequenos. Esta mistura foi umedecida ligeiramente e estendida em placas de Petri, de modo a formar-se uma camada não espessa, que permaneceu em repouso à temperatura de 25 ° C em estufa incubadora BOD (Fanem, São Paulo) por 5 dias (NEVES *et al.*, 2000). Após esse procedimento, as larvas foram recolhidas pelo método Baermann-Moraes (BAERMANN,1917; MORAES, 1948).

### 3.4 - Método de Baermann-Moraes para obtenção de Larvas

O método de Baermann-Moraes (BAERMANN,1917; MORAES, 1948), foi empregado com objetivo de obtenção das larvas presentes no material fecal pelo método de Looss e no diagnóstico parasitológico de fezes nos pacientes e indivíduos saudáveis analisados. Em um suporte de madeira foram colocados funis de vidro com diâmetro de 11,5 cm, em cuja haste foi colocada mangueira de borracha de 10 cm, na qual foi introduzido um tubo de ensaio de 10 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, e colocado um pinça para obliteração da passagem de água para o tubo.

Cada funil foi preenchido até à borda com água à temperatura de 45 ° C, e sobre o mesmo colocou-se uma tela metálica (100 malhas por cm<sup>2</sup>) e sobre esta uma gaze dobrada em quatro. Em seguida, depositou-se sobre a mesma, aproximadamente, 10 g de fezes sem conservante que em contato com a água aquecida, permaneceu em repouso por uma hora. Posteriormente, foi retirado um tubo de ensaio com cerca de 5 a 7 mL de solução contendo água. Procedeu-se a centrifugação desta solução em tubo de ensaio a 1.000 x g por 15 minutos e cinco procedimentos de lavagem das larvas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 0,15M pH 7,2 durante três minutos. Após a última lavagem, o sedimento contendo as larvas foi ressuspensionado distribuído em alíquotas e conservado a -20 ° C até o momento do uso.

### 3.5 - Produção do extrato salino de *S. ratti*

As larvas de *S. ratti* obtidas foram descongeladas e ressuspensionadas em 3mL de PBS (salina tamponada com fosfato) sem inibidores de proteases. As mesmas foram rompidas, para extração protéica com auxílio de homogeneizador de tecidos (Glas-Col) por cinco períodos de um minuto em banho de gelo e posteriormente, através de ultra-som

(Thorton, Inpec Eletrônica São Paulo) a 40 KHz em oito ciclos de 20 segundos em banho de gelo. O material foi incubado sob agitação lenta por 18 horas a 4 ° C para extração antigênica, e centrifugado a 12.400 x g por 30 minutos a 4 ° C em centrífuga refrigerada (Sorvall, RC5Cplus, USA). O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

### **3.6 - Diagnóstico parasitológico de fezes**

#### **3.6.1 - Amostras fecais**

Foram colhidas três amostras fecais de cada indivíduo, em frascos plásticos sem conservante e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia para realização do diagnóstico parasitológico.

#### **3.6.2 - Método de Baermann-Moraes**

Método descrito de acordo com item 3.4 para detecção de larvas de *S. stercoralis*.

#### **3.6.3 - Método de Hoffman, Pons e Janer (1934)**

Esse método foi utilizado para detecção de ovos, cistos ou larvas de enteroparasitos. Aproximadamente 2 g de fezes de cada amostra foram colocadas em um *becker* com cerca de 5 mL de água e trituradas por meio de um bastão de vidro. Em seguida acrescentou-se 20 mL de água e filtrou-se a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 mL de capacidade,

utilizando-se uma tela de náilon com cerca de 100 malhas por  $\text{cm}^2$  coberta com gaze cirúrgica dobrada em quatro.

Os resíduos contidos na gaze foram lavados com aproximadamente 20 mL de água, o líquido da lavagem foi recolhido no mesmo cálice e completado para 200 mL. Esta suspensão de fezes permaneceu em repouso durante 24 horas. Findo esse tempo, uma gota de sedimento e de lugol foram depositados numa lâmina de microscopia. Após homogeneização, o material foi coberto por lamínula (24 x 24mm) e examinado em microscópio óptico comum (Olympus CH-2, Japão), no aumento de 100 e 400 X. Das três amostras colhidas de cada indivíduo foram preparadas três lâminas, de cada uma delas, sendo estas analisadas por três examinadores diferentes.

### **3.7 – Diagnóstico imunológico**

Amostras de soros foram processadas simultaneamente após as padronizações das condições ideais de cada teste descrito a seguir.

#### **3.7.1 - Teste ELISA para detecção de IgG**

Depois de titulados em bloco para definir a concentração ideal do antígeno, amostras de soros e conjugado procedeu ao teste ELISA nas condições ótimas.

Placas de poliestireno foram utilizadas como suporte para adsorção de 50  $\mu\text{L}$  do extrato salino de *S. rattii* na concentração ideal de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. As placas, mantidas em câmara úmida, foram sensibilizadas a 4 ° C durante 18 horas. Após este período e três lavagens de cinco minutos com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) a 0,05% foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de duas amostras de soros padrões

positivos, três padrões negativos e amostras de soro dos grupos I, II, III na diluição 1 : 40. Após incubação por 45 minutos, as placas foram lavadas e adicionado 50 µL de anti IgG humana marcada com peroxidase (CALBIOCHEM, USA), no título 2000 por um período de 45 minutos a 37 ° C. Após as três lavagens, a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e solução cromógena de ortofenileno diamina (OPD), preparado no momento do uso (5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + 5 mg de OPD + 12,5 mL de tampão citrato fosfato pH 5) (SIGMA). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e os valores de absorbância foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (TITERTEK MULTISKAN PLUS MKII, FLOW LABORATORIES McLean, USA). O limiar da reatividade (*cut off*) foi determinado pela média aritmética das densidades ópticas das três amostras de soros padrões negativos acrescidos de cinco desvios padrão para cada reação.

### **3.7.2 - Teste ELISA para detecção de IgG1 e IgG4 específicas anti-*Strongyloides stercoralis***

Depois de titulados em bloco para definir a concentração ideal do antígeno, amostras de soros e conjugado procedeu ao teste ELISA nas condições ótimas.

Microplacas de poliestileno de alta afinidade foram sensibilizadas por 18 horas a 4 ° C com extrato salino de *S. ratti* na concentração ideal de 10 µg/mL diluído em tampão carbonato – bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Em seguida as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS – T) a 0,05% por três períodos de cinco minutos. Foram adicionados 50 µL de duas amostras de soros padrões positivos, três padrões negativos e amostras de soros dos grupos I, II, III nas diluições de 1: 10 (IgG1) e 1 : 2 (IgG4), logo após

foram incubadas a 37 ° C por uma hora em câmara úmida. Subsequentemente após três lavagens de cinco minutos com PBS – T 0,05%, foram incubados os respectivos anticorpos secundários constituído de anti – IgG1 humana biotinizada (1 : 250) e anti – IgG4 humana biotinizada (1: 100) (CALBIOCHEM, USA) por uma hora a 37 ° C. Finalmente após os três períodos de lavagem com PBS – T foi adicionado o conjugado estreptavidina – peroxidase (CALBIOCHEM, USA) na diluição de 1 : 500 (para as placas de IgG1 e IgG4) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi revelada por adição de 5 µL do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e solução cromógena de ortofenileno diamina (OPD), preparado no momento do uso (5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + 5 mg de OPD + 12,5 mL de tampão citrato – fosfato pH 5) (SIGMA). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e os valores de absorbância foram determinados a 492 nm em leitor ELISA (TITERTEK MULTISKAN PLUS MKII, FLOW LABORATORIES McLean, USA). O limiar da reatividade (*cut off*) foi determinado pela média aritmética das densidades ópticas das três amostras de soros padrões negativos acrescidos de cinco desvios – padrões para cada reação.

### 3.8 - Análise Estatística

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o software GRAPHAD PRISM versão 3.0 (GRAPHAD SOFTWARE, INC).

A determinação de médias geométricas dos níveis de anticorpos específicos a *S. stercoralis* e as diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste não paramétrico de “Mann Whitney”.

A correlação entre os níveis de IgG e as subclasses (IgG1 e IgG4) específicas a *Strongyloides* foi determinada nos soros dos indivíduos do grupo I. Os coeficientes de correlação foram determinados pelo teste de correlação de "Spearman". Todos os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3.9 – Normas de Biossegurança**

Todo o procedimento de colheita, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges e Mineo, 1997.

## **4 - RESULTADOS**

### **4.1 - Caracterização dos grupos estudados quanto ao sexo e idade**

Distribuição por sexo dos pacientes com estrogiloidíase (Grupo I), outros parasitos intestinais (Grupo II) e indivíduos saudáveis (Grupo III), tabela 1. Foi analisado um total de 100 amostras de soro, sendo 47 indivíduos do sexo masculino e 53 do sexo feminino. Suas idades variaram de 2 a 75 anos de idade no grupo I ( $n = 40$ ), de 4 a 62 anos no grupo II ( $n = 30$ ) e de 2 a 62 anos no grupo III ( $n = 30$ ).

**Tabela 1** - Distribuição por sexo dos 100 indivíduos estudados, sendo 40 pacientes com estrogiloidiase (Grupo I), 30 pacientes com outros parasitos intestinais (Grupo II) e 30 indivíduos copronegativos (Grupo III).

SEXO	TOTAL n(%)	GRUPOS		
		GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
		n(%)	n(%)	n(%)
MASCULINO	47 (47)	19 (47,5)	17 (56,7)	11 (36,6)
FEMININO	53 (53)	21 (52,5)	13 (43,3)	19 (63,3)
TOTAL	100 (100)	40 (100)	30 (100)	30 (100)

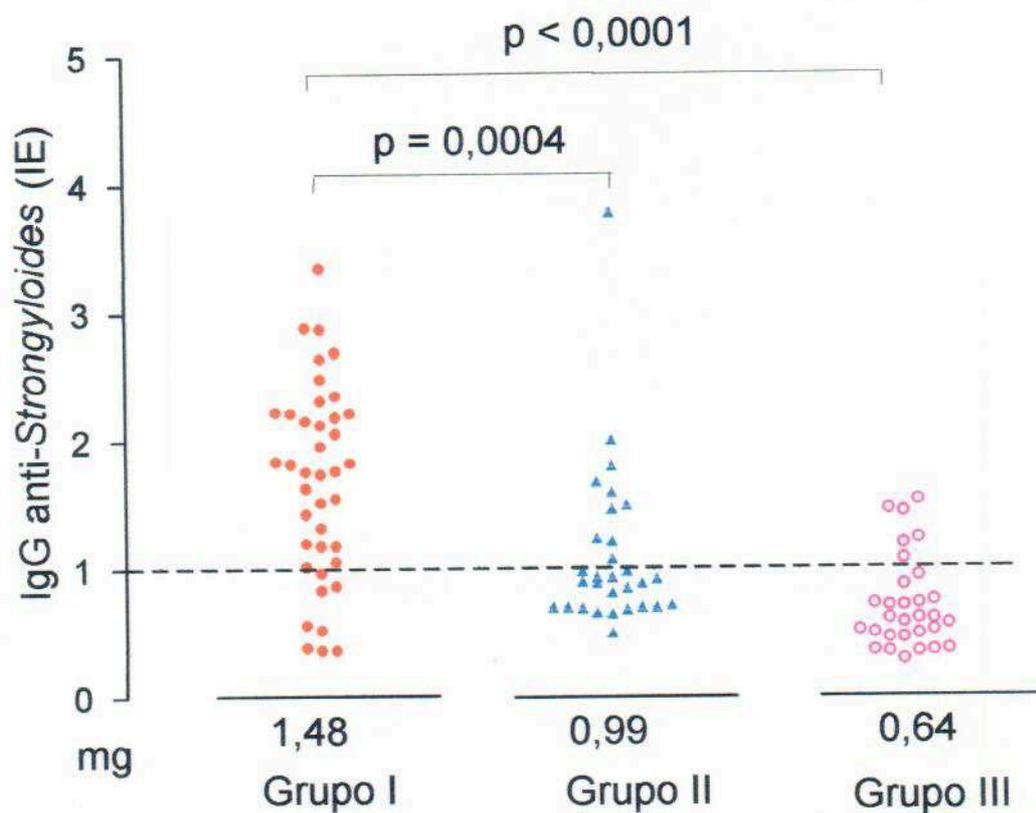
#### 4.2 - Obtenção do antígeno heterólogo de Larvas de *S. ratti*

Para obtenção do extrato salino de *S.ratti*, foram utilizadas 200.000 larvas filarióides. A concentração protéica obtida foi de 500 µg/mL e volume de 4 mL.

#### 4.3 - Detecção de IgG e subclasses IgG1 e IgG4 anti-*Strongyloides* pelo teste ELISA

Os níveis de IgG anti-*Strongyloides*, expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soros de pacientes e de indivíduos saudáveis estão demonstrados na figura 1.

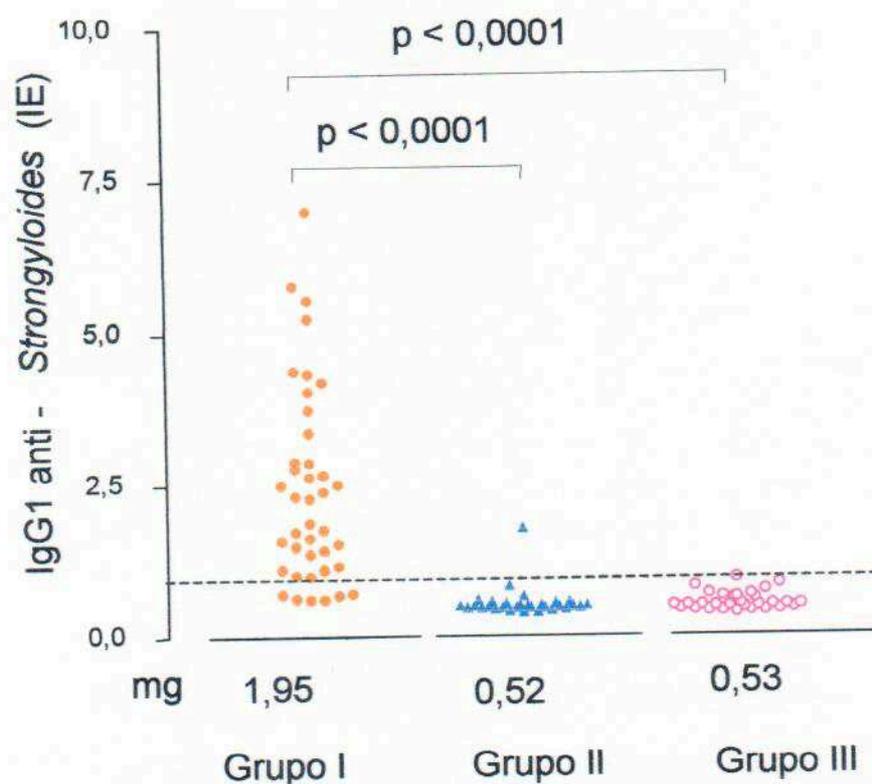
A média geométrica do grupo I (1,48) foi estatisticamente maior que as médias nos grupos II (0,99;  $p = 0,0004$ ) e grupo III (0,64;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 1.** Níveis de IgG expressos em índice ELISA (IE) utilizando extrato antigênico heterólogo de *S. ratti* em 40 amostras de soros de pacientes do grupo I (copropositivos), 30 pacientes do grupo II (outros parasitos intestinais) e 30 amostras do grupo III (copronegativos). A linha tracejada indica o limiar de positividade ( $IE \geq 1$ ); mg = média geométrica.

A figura 2 demonstra os níveis de IgG1 anti-*Strongyloides*, expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soros de pacientes e de indivíduos saudáveis.

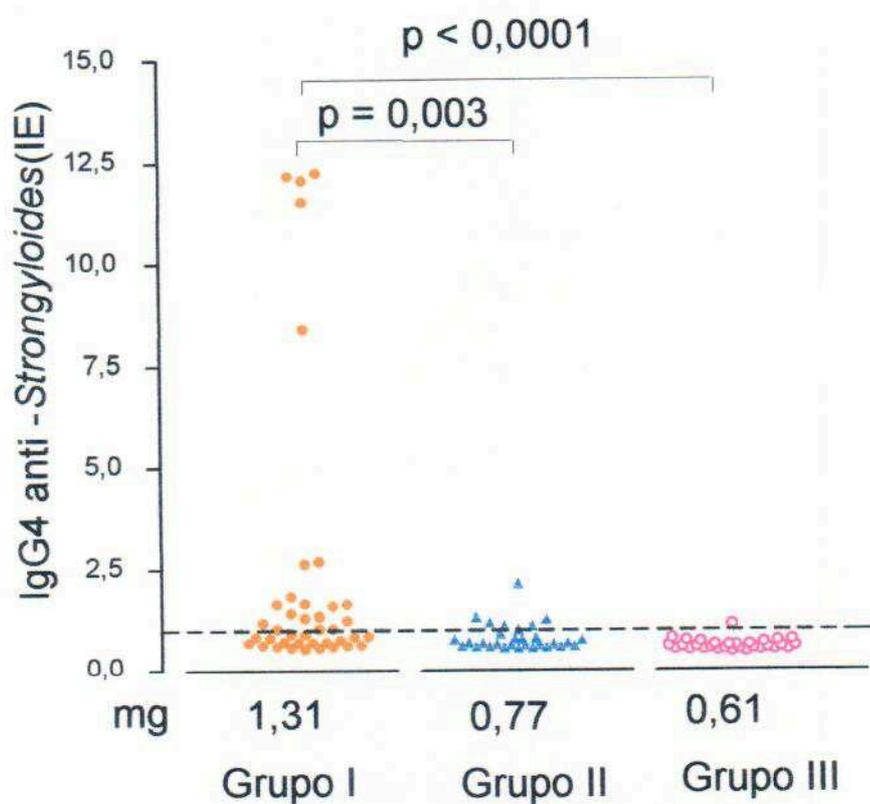
A média geométrica do grupo I (1,95) foi estatisticamente maior que as médias nos grupos II (0,52;  $p < 0,0001$ ) e III (0,53;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 2.** Níveis de IgG1 expressos em índice ELISA (IE) utilizando extrato antigênico heterólogo de *S. ratti* em 40 amostras de soros de pacientes do grupo I (copropositivos), 30 pacientes do grupo II (outros parasitos intestinais) e 30 amostras do grupo III (copronegativos). A linha tracejada indica o limiar de positividade ( $IE \geq 1$ ); mg = média geométrica.

A figura 3 demonstra os níveis de IgG4 anti-*Strongyloides*, expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soro de pacientes e de indivíduos saudáveis.

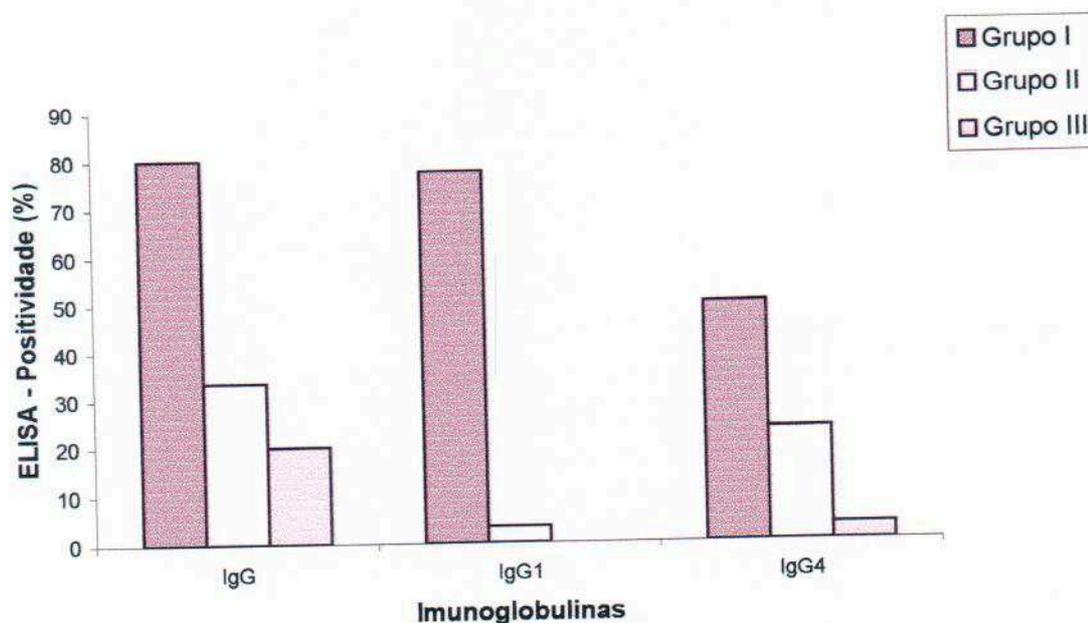
A média geométrica do grupo I (1,31) foi estatisticamente maior que as médias nos grupos II (0,77;  $p = 0,003$ ) e III (0,61;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 3.** Níveis de IgG4 expressos em índice ELISA (IE) utilizando extrato antigênico heterólogo de *S. ratti* em 40 amostras de soros de pacientes do grupo I (copropositivos), 30 pacientes do grupo II (outros parasitos intestinais) e 30 amostras do grupo III (copronegativos). A linha tracejada indica o limiar de positividade (IE  $\geq$  1); mg = média geométrica.

#### 4.4 – Positividade do teste ELISA na detecção de IgG e subclasses IgG1 e IgG4 anti-*Strongyloides*

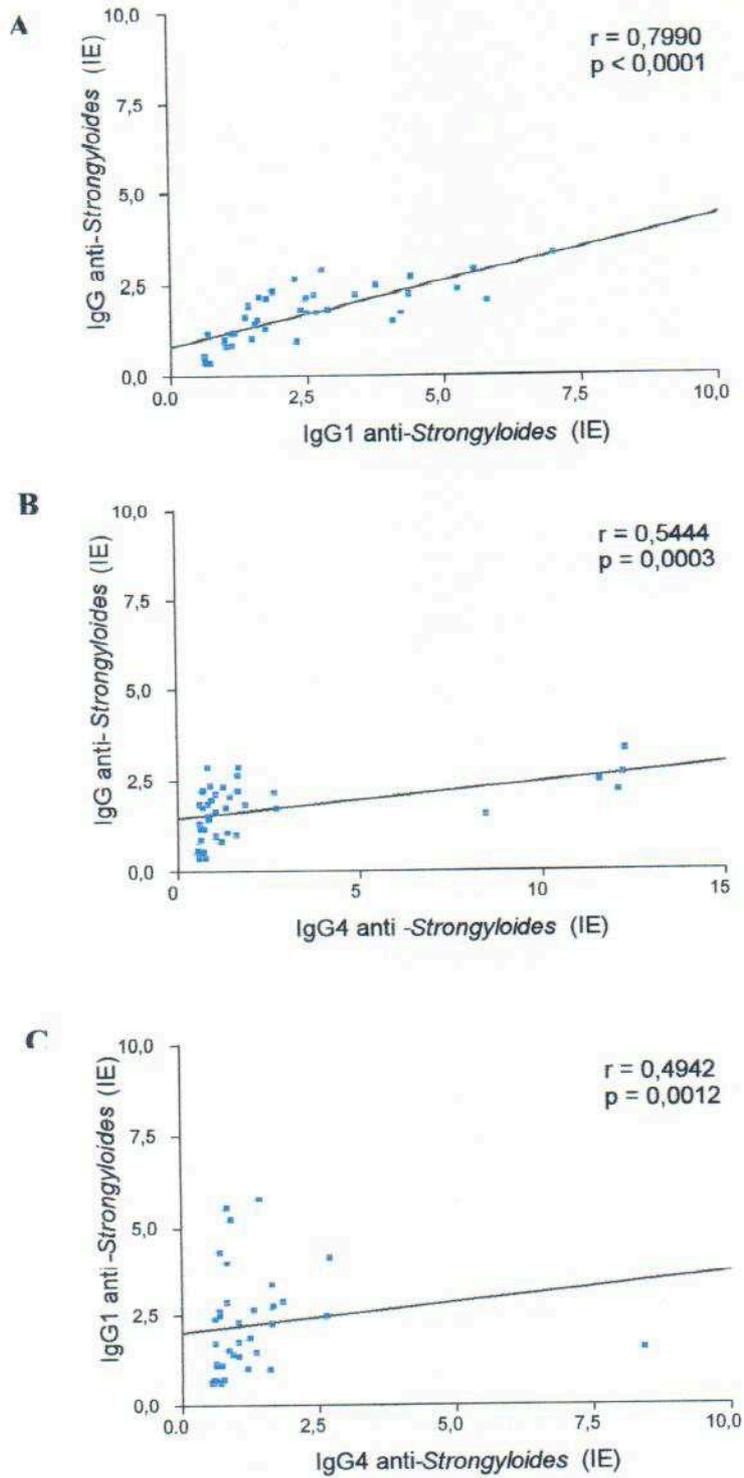
A figura 4 demonstra os valores de positividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG4 em amostras de soros pelo teste ELISA. Verificou-se maior positividade no grupo I para IgG (80%), IgG1 (77,5%) e IgG4 (50%) em relação ao grupo II, IgG (33,3%), IgG1 (3,3%) e IgG4 (23,3%) e III IgG (20%), IgG1 (0%) e IgG4 (3,3%).



**Figura 4.** Positividade da IgG, IgG1 e IgG4 no teste ELISA dos 40 pacientes do grupo I (copropositivos), 30 pacientes do grupo II (com outras parasitoses) e 30 indivíduos do grupo III (copronegativos).

#### 4.5 - Correlação entre os níveis de anticorpos IgG e subclasses IgG1 e IgG4 específicas anti - *Strongyloides*

A correlação entre os níveis de IgG e subclasses IgG1 e IgG4 anti- *Strongyloides* foi analisada em amostras de soros de pacientes do grupo I. Observou-se correlação positiva entre os níveis de IgG e IgG1 ( $r = 0,7990$ ;  $p < 0,0001$ ) e IgG e IgG4 ( $r = 0,5444$ ;  $p = 0,0003$ ), entretanto entre as subclasses IgG1 e IgG4 houve uma correlação fraca ( $r = 0,4942$ ;  $p = 0,0012$ ) (figura 5).



**Figura 5.** Correlação entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* versus anticorpos IgG1 (A) e IgG4 (B); IgG1 e IgG4 em soros de pacientes do grupo I. Correlação de Spearman

## 5 - DISCUSSÃO

A utilização de testes sorológicos tem demonstrado que estes podem ser utilizados em conjunto com os exames de fezes no diagnóstico da estrogiloidíase, ou ainda como uma técnica de monitoramento em pacientes submetidos a transplantes tanto antes quanto pós cirurgia, bem como outras circunstâncias que levam a uma queda da resposta imune do hospedeiro. Os testes sorológicos são úteis principalmente, quando a pesquisa coprológica revela-se negativa na presença de sintomatologia sugestiva, visto que na maioria das vezes em infecção crônica o número de larvas é bastante reduzido e às vezes ausentes nas fezes (CONWAY *et al.*, 1993 a,b).

Diante da dificuldade de se obter quantidades suficientes de larvas filarióides de *S. stercoralis*, tornou-se conveniente a padronização e utilização de antígenos heterólogos, provenientes de *S. ratti*, espécie que pode ser utilizada como fonte segura de antígenos para o sorodiagnóstico substituindo o antígeno de *S. stercoralis* (GROVE; BLAIR; 1981; ROSSI *et al.*, 1993; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

Neste estudo verificou-se que os pacientes com estrogiloidíase (Grupo I) apresentaram níveis significativamente aumentados de IgG anti-*Strongyloides* (Figura 1) quando comparados aos pacientes com outros parasitos intestinais (Grupo II) e com os indivíduos copronegativos (Grupo III). No entanto verificou-se reatividade para IgG nos grupos II e III, embora o teste ELISA seja altamente sensível, a hipótese de reatividade cruzada não deve ser descartada e também a possibilidade de contato com *S. stercoralis* nesses indivíduos, apesar dos exames parasitológicos dos mesmos serem negativos para ocorrência deste parasito (LINDO *et al.*, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ *et al.*, 1999).

Adicionalmente os níveis de IgG1 anti-*Strongyloides* foram significativamente maiores no grupo I quando comparados aos grupos II e III, o elevado nível dessa imunoglobulina pode ser atribuído a sua alta proporção no soro (66% da IgG total) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Atkins *et al* em 1997, ao estudarem uma população com estrogiloidíase verificaram que os níveis de IgG1 eram inversamente correlacionados com a idade. Genta e Lillibridge em 1989, encontraram altos níveis de IgG1 em pacientes imunossuprimidos portadores de *S. stercoralis*.

Em contraste, níveis de IgG4 anti-*Strongyloides* foram significativamente mais elevados no grupo I quando comparados aos grupos II e III, porém verificou-se menor número de indivíduos com níveis de IgG4 aumentados (50%).

Vários estudos demonstraram que a presença de IgG4 no soro de pacientes com estrogiloidíase atua como fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por IgE, através da competição ou inibição de sua ligação à célula (principalmente mastócitos) (ATKINS *et al.*, 1997; VERCELLI, *et al.*, 1998; ATKINS *et al.*, 1999). Estudo realizado em 28 pacientes de uma área endêmica na Jamaica demonstrou que a produção elevada de

IgG4 em combinação com a baixa de IgE, podem estabelecer a infecção e gerar a estrogiloidíase crônica e assintomática (ATKINS *et al.*, 1997). Por outro lado pode se observar que os pacientes do grupo II e o grupo III reagiram positivamente para IgG4 anti-*Strongyloides*, esses resultados não são condizentes com os obtidos por Genta e Lillibridge, 1989 que demonstraram maior especificidade deste anticorpo em soro de paciente com estrogiloidíase.

Pode-se observar que a subclasse IgG1 apresentou maior reatividade nos pacientes do grupo I quando comparado à reatividade de IgG4, sugerindo assim que essas duas subclasses de anticorpos poderiam estar reconhecendo mesmo epítipo em uma mesma porção antigênica (CONWAY *et al.*, 1994).

Há relatos de que indivíduos co-infectados com *S. stercoralis* e HTLV-1 (vírus da infecção linfotrófica de células T humanas) pode ocorrer um balanço imunológico a favor do parasito, sendo assim observa-se nesses indivíduos um elevado nível dos anticorpos IgG4, o que poderia estar interferindo no mecanismo de resposta imune do hospedeiro, contribuindo para a diminuição da proteção do mesmo, culminando em infecções mais severas (GROVE, 1996; RAMACHANDRAN *et al.*, 1998; ADEDAYO; GRELL, 2001).

Considerando os resultados obtidos ressalta-se a importância da detecção de anticorpos IgG e as subclasses IgG1 e IgG4 em amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase, visto que o elevado nível de anticorpos, principalmente IgG4 pode interferir na clínica do paciente. De acordo com estudos realizados em áreas endêmicas para estrogiloidíase demonstra-se a importância do imunodiagnóstico principalmente em decorrência da dificuldade de se encontrar este parasito em exames parasitológicos, o que pode favorecer o estabelecimento de estrogiloidíase disseminada ou da síndrome da hiperinfecção em indivíduos imunodeprimidos, seja por desnutrição corticoideterapia,

SIDA ou presença do HIV, leucemias, linfomas, entre outros (DEVAUTT-JR *et al.*, 1990; ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; FERREIRA *et al.*, 1999; TING, 2000).

## 6 – CONCLUSÕES

Foi possível diferenciar as respostas imunes das subclasses IgG1 e IgG4 no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana.

A detecção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG4 demonstraram ser mais específicos do que a IgG no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana.

A utilização das subclasses IgG (IgG1 e IgG4) é útil no auxílio do diagnóstico da estrogiloidíase humana.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H. A.; POBER, S. J. **Imunologia celular & molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 72 – 73.

ADEDAYO, A. O.; GRELL, G. A.; BELLOT, P. Case study: Fatal strongyloidiasis associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 650 – 651, 2001.

ANANTHAKRISHNAN, S.; NACINI, P.; PANI, S. P. Intestinal geo helminthiasis in the developing world. **National Medical Journal of India**, v. 10, n. 2, p. 67 – 71, 1997.

ANDRADE NETO, J. L. DE; ASSEF, M.C. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 1373 – 1378.

\*Segundo normas da ABNT, NBR 6023: 2002.

ATKINS, N. S.; LINDO, J. F.; LEE, M. G.; CONWAY, D. J.; BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 91, p. 609 – 613, 1997.

ATKINS, N. S.; CONWAY, D.J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A. P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21 p. 517 – 526, 1999.

BAERMANN, G. Eine infache methode zur auffindung von Anckylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. Mededeel. Mit. H. Geneesk. Batavia: **Laboratories Weltrevreden Feestbundel**, p. 41 – 47, 1917.

BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillulla intestinalis*) nouveau ver nímatoide trove par le Dr. Normand chez les nalades attents de diarrhea de Cochichine. **Compose Rend. Science Biologique**, v. 84, p. 258 – 266, 1876.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratório**. Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberândia, 1997, 55p.

CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; LILLYWHITE, J. E.; BAYLEI, J. W.; ROBINSON, R. D.; LINDO, J. F.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: A method for increasing the specificity of the indirect ELISA.

**Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 173 – 176, 1993a.

CONWAY, D. J.; BAYLEI, J. W.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. Serum IgG reactivity with 41 kDa, 31 kDa and 28 kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 784 – 787, 1993b.

CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P.; BIANCO, A. E. *Strongyloides stercoralis*: Characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 99 – 105, 1994.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2000, p. 247 – 258.

COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome cuts of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 313 – 317, 1997.

COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected on filter paper in Abadia dos Dourados

(Minas Gerais, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329 – 331, 1998.

COSTA-CRUZ, J. M.; MADALENA, J.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; CAMPOS, D. M. B.; TAKETOMI, E. A. Determinação de IgE específica e total por ELISA em amostras de soros na estrogiloidíase humana. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 16.; Poços de Caldas: **Resumos**. Belo Horizonte, 1999, p.127.

DEVAULT, JR. G. A.; KING, J. W.; ROHR, M. S.; LANDRENEAU, M. D.; BROWN, S. T.; McDONALD, J. C. Opportunistic infection with *Strongyloides stercoralis* in renal transplantation. **Revista Infectious Diseases**, v. 12, p. 653 – 671, 1990.

FERREIRA, M. S. Estrogiloidíase. In: VERONESI, R., FOCCACIA, R., DIETZE, R. (Eds). **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 1991, p. 856 – 865.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, A. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; ARAÚJO, F. F. N. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154 – 155, 1999.

GAM, A. A.; NEVA, F. A.; KROTOSKI, W. A. Comparative sensivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 37, p. 157 – 161, 1987.

- GENTA, R. M. Strongyloidiasis In: **Immunodiagnosis of Parasitic Diseases**, Wallks, K & Schantz, P. (editors). New York, 1986.
- GENTA, R. M.; LILLIBRIDGE, J. P. Prominence of IgG4 antibodies in the human responses to *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Infectious Diseases**. v.160, p. 692 – 699, 1989.
- GENTA, R. M.; MILES, P.; FIELDS, K. Opportunistic *Strongyloides stercoralis* infection in lymphoma patients. **Cancer**, v. 63, p. 1407 – 1411, 1989.
- GILL, G. V.; BELL, D. R.; FIELDS, R. Lack of immunoglobulin E response to longstanding strongyloidiasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 37, 292 – 294, 1979.
- GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251 – 309, 1996.
- GROVE, D. I. Diagnosis in strongyloidiasis: a major roundworm infection of man. London 1989 p. 175 – 197. Taylor and Francis.
- GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344 – 349, 1981.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal Public Health of Tropical Medicine**, v. 9, p. 283 – 291, 1934.

KOBAYASHI, J.; HASENGAWA, H.; SOARES, E. C.; TOMA, H.; DACAL, A.R.C.

D. O.; BRITO, M. C.; YAMANAKA, A.; FOLI, A.; SATO, Y. Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Maceio, Brazil, by the Agar plate faecal culture method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 279-283, 1996.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2. ed., Minneapolis: Burgess, 1979. 427p. Cap. 1: Introduction to the Nematoda, p. 42 – 43.

LINDO, J. F.; CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting methods for diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 175 – 179, 1994.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265 – 275, 1951.

LUTZ, A.V. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121 – 125, 1919.

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other parasites in children at Uberlândia city State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 161-164, 1998.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 1, p. 507 – 624, 1948.

MORI, J. C.; PIRES, M. C.; GALVÃO, C. E. S.; MELLO, J. F.; MONTEALEGRE, F. Determination of *Blomia tropicalis* – specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 56, p. 180 – 184, 2001.

NEVA, F. A.; GAM, A. A.; BURKE, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. **Journal of Infectious Diseases**. v.144, p. 427 – 432, 1981.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARD, P. M. **Parasitologia Humana**, 10. ed., Belo Horizonte: Atheneu, 2000, p. 405 – 414.

OLIVEIRA, L. C. M.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA-CRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 119-121, 2002.

PAULA, F. M.; CASTRO, E. D.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M. G.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and imunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 51-55, 2000.

PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p. 507 – 515.

PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*, **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, p. 175 – 182, 1993.

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis. **Parasite Immunology**, v. 177, p. 196 – 203, 1998.

REY, L. **Parasitologia**, 3. ed., Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 581- 590.

ROITT, I.; BRASTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5 ed. São Paulo: Manole, 1999, 423 p.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; PARTEL, C. D.; TEODORO, L. G. V. L.; da SILVA, L. J. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 361 – 365, 1993.

ROTTERDAM, H., TSANG, P. Gastrointestinal disease in the immunocompromised patient. **Human Pathology**, v. 25, n.11, p. 1123 – 1140, 1994.

SANDGROUND, J. H. Speciation and specificity in the nematode genus *Strongyloides*. **Parasitology**, v. 12, p. 59 – 81, 1925.

SATO, Y., KOBAYASHI, J., SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista de Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 35 – 41, 1995.

SIDDIQUI, A.A. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. **Parasitology Research**, v. 83, p. 655 – 658, 1997.

SIDDIQUI A. A.; STANLEY, C. S.; BERCK S. L. cDNA encoding a nuclear hormone antigen of steroid/thyroid hormone-receptor superfamily from the human parasitic nematode *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology Research**, v. 86, p. 24 – 29, 2000.

TING, Y. M. Pulmonary strongyloidiasis – cases report of 2 cases. **Journal Medicine Science**, v. 16, p. 269 – 274, 2000.

VERCELLI, D.; MONTE, D. L.; MONTICELLI, S.; BARTOLO, D. I. C.; AGREST, A. To E or not E? Can na IL-4 Induced B cell choose between IgE and IgG4? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 116, p. 1 – 4, 1998.

ZYGMUNT, D. J. *Strongyloides stercoralis*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.11, n.9, p. 495 – 497, 1990.