

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

**ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS EXTRATOS
ANTIGÊNICOS HETERÓLOGOS NA DETECÇÃO
DE ANTICORPOS IgA ANTI-*Strongyloides stercoralis*
PELO TESTE ELISA EM AMOSTRAS DE SOROS**

IDESSANIA NAZARETH DA COSTA

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

UBERLÂNDIA - MG
JULHO / 1999

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

**ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS EXTRATOS
ANTIGÊNICOS HETERÓLOGOS NA DETECÇÃO
DE ANTICORPOS IgA ANTI-*Strongyloides stercoralis*
PELO TESTE ELISA EM AMOSTRAS DE SOROS**

IDESSANIA NAZARETH DA COSTA

Prof.^a Dra. JULIA MARIA COSTA-CRUZ
Orientadora

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

UBERLÂNDIA – MG
JULHO / 1999

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

**ESTUDO COMPARATIVO DE DOIS EXTRATOS
ANTIGÊNICOS HETERÓLOGOS NA DETECÇÃO
DE ANTICORPOS IgA ANTI-*Strongyloides stercoralis*
PELO TESTE ELISA EM AMOSTRAS DE SOROS**

IDESSANIA NAZARETH DA COSTA

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 08/07/99

Nota 100

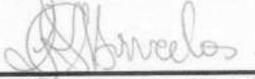
Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Profa. Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas


Prof.ª. Dra. JULIA MARIA COSTA-CRUZ

Orientadora
Membro nato da banca examinadora


Prof.ª. Dr. JOSÉ ROBERTO MINEO

Segundo membro da banca examinadora


Ms. IVANILDES SOLANGE BARCELOS

Terceiro membro da banca examinadora

Uberlândia, 08 de julho de 1999.

DEDICO

*À Deus, Pai sublime de amor e bondade, por ter
me concedido a vida.*

*Aos meus queridos pais, João e Nair, assim como
meu irmão Risley, pela compreensão e
incentivo.*

*Aos meus padrinhos Vicente e Nazir pela
confiança.*

*Àqueles que torcem pela realização e felicidade
de todos.*

AGRADECIMENTOS

"Muitas vezes nos assemelhamos àqueles que caminham num deserto inóspito, sem nada em torno de si que lhes fale de vida, de alento e beleza. Caminhamos cansados, tristes, desolados, mas encontramos um oásis, um oásis repleto de verde, tâmaras, coqueiros, palmeiras..."

Não só, mas em especial durante a realização deste trabalho pude encontrar em muitos esse oásis capaz de renovar as energias, estimular o avanço, possibilitar o descanso, ser o refrigerio... por isso só tenho a agradecer. Começo pelo grande Pai de misericórdia, Deus, que possibilitou tudo isso.

Agradeço também:

aos meus queridos pais, João e Nair, pelo carinho e estímulo.

À professora Dr^a Julia Maria Costa-Cruz pela oportunidade de ingresso na vida científica e pelo exemplo de profissionalidade.

Ao professor Dr^o José Roberto Mineo por ter aceito contribuir no enriquecimento desse trabalho.

À Ms. Ivanildes Solange Barcelos que muito me ensinou, profissional e moralmente com sua simplicidade e dedicação, excedendo por vezes, horas após seu expediente me acompanhando nos testes laboratoriais.

A todos técnicos do Laboratório de Parasitologia pela receptividade e atenção, principalmente à Graça, Rosário e Geraldo.

Ao professor Vanderli Anacleto de Campos pelo auxílio nos cálculos estatísticos.

À Alderi e Idelma pelo fornecimento de materiais do H. C. da UFU.

Aos órgãos de pesquisa CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Sou imensamente grata à Dircelina e Luciana pela "força" inicial e ajuda. Também à Kely, Fabiana, Gleyce e Joaquina.

Aos amigos que encontrei ao longo desses anos na Universidade com os quais muito aprendi, em especial à todos integrantes da 44ª turma de Biologia. Assim como aos professores, secretárias e coordenação do curso.

Às amigas Fabiola, Noella e Simone e ao amigo Lourenço por sua companhia e preocupação.

Agradeço em especial ao querido Fred e à amiga Elaine por dedicarem horas de seu tempo em auxílio à realização deste trabalho, pelo apoio e pelas conversas descontraídas, muito obrigada.

Aos amigos invisíveis por tentarem sempre nos intuir para os valores nobres que a vida oferece..

À todos cujos nomes não estão nesta página mas que não se apagarão das páginas da minha memória e que ajudaram a compor boa parte da história da minha vida.

OBRIGADA.

RESUMO

O estudo da estrogiloidíase tem recebido especial atenção nos últimos tempos, principalmente nas regiões tropicais. Pesquisas são realizadas na tentativa de precocemente diagnosticar a presença da infecção por *Strongyloides stercoralis*. Esse trabalho teve como objetivo detectar a presença de anticorpos IgA específica circulantes através do teste ELISA utilizando larvas filarióides de *Strongyloides ratti* com extrato salino e alcalino. Avaliou-se reações cruzadas com outras parasitoses. Amostras de soros de 186 indivíduos foram analisados, 61 indivíduos estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes, 60 amostras de soros de indivíduos controles saudáveis (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 10 µg/ml de extrato salino ou alcalino de *S. ratti* foram adicionadas os soros padrão positivo, negativo e soros testes na diluição 1: 20 e posteriormente seriada na razão dois. O título ideal do conjugado IgA de cabra anti IgA humano peroxidase foi de 1000 para ambos os extratos. Considerou-se positiva a reação nos títulos ≥ 20 . A positividade do teste ELISA para detecção de IgA foi de 42,62% para o extrato salino e de 47,54% para o extrato alcalino. Ocorreram 4,62% e 9,23% de reações cruzadas com indivíduos controles parasitados para os extratos salino e alcalino respectivamente. Concluiu-se que os extratos antigênicos salino e alcalino de *S. ratti* podem ser empregados no teste ELISA como auxílio diagnóstico. Apesar da praticidade de preparo e rendimento na dosagem de proteínas do extrato alcalino ter sido elevada em relação ao extrato salino, ambos são recomendados, já que não houve diferença estatística significativa entre eles na detecção de anticorpos IgA específica na estrogiloidíase humana.

Palavras chave: *Strongyloides stercoralis*, teste ELISA, imunodiagnóstico, IgA.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Resposta Imune Humoral na Estrongiloidíase e o Papel da Imunoglobulina A IgA).....	06
Antígeno Heterólogo.....	11
2- OBJETIVOS.....	13
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Obtenção de <i>Strongyloides ratti</i>	14
3.1.1. Método de Looss.....	15
3.1.2. Método de Baermann-Moraes	15
3.2. Produção de Extratos Antigênicos Solúveis de para o Teste ELISA.....	16
3.2.1. Produção de Extrato Salino Total de Antígeno de <i>S. ratti</i>	16
3.2.2. Produção de Extrato Alcalino de <i>S. ratti</i>	16
3.3. Amostras de Soros.....	17
3.3.1. Amostras de Soros Controles de Indivíduos Sadios.....	17
3.3.2. Amostras de Soros Controles de Pacientes com Outras Parasitoses.....	19
3.3.3. Amostras de Soros de Pacientes com Estrongiloidíase.....	20
3.3.4. Amostras de Soros Padrão Positivo e Negativos.....	20
3.4. Padronização do teste ELISA frente aos antígenos salino e alcalino.....	20
3.4.1. Determinação da concentração dos antígenos e titulação do conjugado imunoenzimático- IgA.....	20
3.4.2. Teste Imunoenzimático ELISA.....	21
3.5. Análise Estatística.....	22
3.6. Normas de Biossegurança.....	22
4- RESULTADOS.....	23
4.1. Obtenção de <i>Strongyloides ratti</i>	23
4.2. Produção de antígenos para o teste ELISA.....	23
4.2.1. Produção de extratos antigênicos solúveis Para o Teste ELISA.....	23
4.3. Padronização do teste imunoenzimático ELISA frente aos dois antígenos de <i>S. ratti</i>	24
5- DISCUSSÃO.....	34
6- CONCLUSÕES.....	37
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
8- ANEXO.....	50

1. INTRODUÇÃO

O parasita *Strongyloides* sp, pertence ao reino Animalia, sub-reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentasida, ordem Rhabdiorida. A família Strongyloididae é composta por apenas um gênero *Strongyloides* (LEVINE, 1979). O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies podendo o homem ser acometido por três delas: *S. stercoralis*, *S. fuelleborni* e *S. fuelleborni* - "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 foi primeiramente observado em 1876, pelo médico francês Louis Normand, em soldados oriundos da Conchinchina (atual Vietnã), e descrito por Bavay (1876), (PESSÔA & MARTINS, 1982).

S. stercoralis é o único nematódeo, que tem como forma parasitária adulta a fêmea partenogenética, apresentando dois ciclos evolutivos e com capacidade de causar auto-infecção (GRANOT *et al.*, 1983; PIRES & DREYER, 1993; GOMES-MORALES *et al.*, 1995).

A auto-infecção interna pelo parasita é conseqüência que as larvas rhabditóides ainda na luz intestinal transformem-se em larvas filarióides que penetram na mucosa intestinal, alcançando os vasos sangüíneos e linfáticos e se

disseminem por todo o organismo do hospedeiro, causando vários sintomas (LAURIA-PIRES, 1989; PIRES & DREYER, 1993; GOMES-MORALES *et al.*, 1995; GROVE, 1996).

S. stercoralis apresenta dois ciclos evolutivos, ambos monoxênicos. O primeiro é direto ou partenogenético, no qual as larvas rabditóides chegam ao exterior junto com as fezes, sendo depositadas em terreno arenoso, umidade alta e temperatura de 25-30°C, as larvas transformam-se em larvas filarióides infectantes em 24-72 horas. O segundo tipo é o indireto ou de vida livre, no qual as larvas rabditóides eliminadas chegam ao meio exterior junto com as fezes e, alcançando o terreno, transformam-se em machos e fêmeas de vida livre. Essas formas realizam a cópula e a fêmea inicia a ovoposição. Os ovos sob condições favoráveis de temperatura e umidade, tornam-se embrionados. Em seguida, as larvas rabditóides eclodem, permanecendo em liberdade (NEVES *et al.*, 1995).

A estrogiloidíase pode causar diversos quadros clínicos de gravidade variável. As pessoas imunocompetentes e infectadas com baixa carga parasitária, são geralmente assintomáticas correspondendo a 50% dos casos. Nas infecções maciças há o aparecimento de diarreia, desidratação, má absorção, má nutrição que podem ou não levar o indivíduo a óbito. Nos pacientes imunodeprimidos, podem causar hiperinfecção cujos sintomas são graves, podendo o indivíduo evoluir para a morte, se não for realizado um diagnóstico e tratamento correto (BRASITUS *et al.*, 1980; MILDNER *et al.*, 1981; PIRES & DREYER, 1993; CONWAY *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1995a; MUELLER, *et al.*, 1998).

As observações acumuladas, há cerca de 10 anos, de uma série de casos graves e fatais da estrogiloidíase, induzidos por corticosteróides e/ou terapêutica imunossupressora, utilizada particularmente para o tratamento de doenças malignas e nefropatias, revelaram interessante "modelo" da exacerbação de uma infecção latente, muitas vezes assintomática, permitindo avaliar a

possível importância dos mecanismos imunológicos na manutenção do estado de equilíbrio parasita-hospedeiro (GOMES, 1981).

Desde 1960 o tiabendazol e o albendazol têm sido as drogas escolhidas para o tratamento de *S. stercoralis*, mas apresentam vários efeitos colaterais não apresentando eficácia em programas de controles de endemia. Estudos recentes demonstraram que o ivermectina tem sido a droga mais eficaz e segura no controle de doenças endêmicas como a estrogiloidíase humana (LINDO *et al.*, 1996).

S. stercoralis apresenta-se amplamente disseminado nos trópicos e subtropicais, onde as condições climáticas favoráveis, a alta concentração populacional de baixo poder econômico e cultural, a deficiência de educação sanitária e a falta de saneamento básico permitem o desenvolvimento e a manutenção do agente no meio ambiente (MILDER *et al.*, 1981; GRANOT *et al.*, 1983; MAHDI *et al.*, 1993; HALL *et al.*, 1994).

A estrogiloidíase tem distribuição mundial heterogênea apresentando áreas de predileção no Sudoeste da Ásia, Brasil, Colômbia, Sul dos Apalaches, Leste Europeu, Oeste da África e algumas ilhas do Caribe. Stuerchler em 1981 (apud PIRES & DREYER, 1993) definiu três regiões mundiais de acordo com a prevalência da infecção pelo *S. stercoralis*: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%).

Durante 24 anos (outubro de 1953 a dezembro de 1977), GOMES (1981) realizou um estudo sistematizado em 73 (1,8% do total de necropsias) casos fatais de estrogiloidíase em pacientes de Salvador (BA), através da revisão dos prontuários clínicos e com necropsias completas. Este estudo caracterizou um grupo de pacientes (53,4%), onde a helmintose foi a doença principal e a causa do êxito letal e outro grupo (46,5%), em que a verminose se associou e/ou complicou o curso evolutivo de outras condições clínicas. Dessas condições ressaltaram-se 13 casos com doenças básicas variadas (predominando

nefropatias e tumores malignos), todos relacionados ao uso de agentes terapêuticos capazes de promover depressão imunológica.

Em um trabalho realizado no Rio de Janeiro (RJ), NOLETO *et al.* (1990) constataram estrogiloidíase disseminada fatal em 13 casos necropsiados, com idade entre 11 e 64 anos; em todos havia uma condição desencadeante prévia: desnutrição crônica, uso de corticosteróides, infecção respiratória aguda ou síndrome de Cushing.

A ocorrência de 16 casos (0,5%) de estrogiloidíase em necropsias em Uberlândia (MG), foi verificada por COSTA-CRUZ *et al.* (1995) numa análise de 3.047 laudos, no período de janeiro de 1971 a maio de 1995. Em 15 casos, houve localização intestinal com maciça quantidade de larvas e ovos do parasita, sendo dois casos de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

MACHADO & COSTA-CRUZ (1998) demonstraram que Uberlândia (MG) é uma região hiperendêmica, pois utilizando os métodos de Baermann-Moraes e o de Lutz, realizados no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia registraram 13% de ocorrência da infecção por *S. stercoralis* em crianças de 4 meses a 7 anos de idade da área urbana do município, após a leitura de 9900 lâminas.

Um estudo da associação entre *S. stercoralis* e pacientes portadores do HIV, durante 77 meses no Hospital Escola de Uberlândia a partir de janeiro de 1990, demonstra 25 casos de estrogiloidíase sendo sete (28%) de síndrome de hiperinfecção (FERREIRA *et al.*, 1999).

Na estrogiloidíase, a pesquisa de larvas nas fezes foi o primeiro exame diagnóstico a ser empregado, desde 1876, e continua sendo o mais utilizado na rotina. O método mais comumente utilizado é o de BAERMANN (1917), que se baseia na migração das larvas pelo seu hidrotermotropismo (PIRES & DREYER, 1993).

A confirmação parasitológica da presença da infecção pode ser dificultada, uma vez que os parasitos são freqüentemente ausentes ou presentes em pequeno número (NEVA, 1986). Nessas condições, repetidos exames fecais por métodos parasitológicos de rotina laboratorial apresentam baixa sensibilidade (SATO *et al.*, 1995a; DREYER *et al.*, 1996). O diagnóstico da estrogiloidíase é definitivo quando, por métodos específicos, larvas do parasita são encontradas nas fezes (BAERMANN, 1917; ARAKAKI *et al.*, 1990; KOGA *et al.*, 1991; KAMINSKY, 1993; SUKHAVAT *et al.*, 1994; SALAZAR *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1995b; SANTOS & PADILHA FILHO, 1996), no fluido duodenal (JONES & ABADIE, 1954; BEAL *et al.*, 1970; ASSEFA *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1994), ou ocasionalmente em outros tecidos ou fluídos de pessoas infectadas (AVRAM *et al.*, 1984; HUARATO SEDDA *et al.*, 1990; MURTY *et al.*, 1994; TAKAYANAGUI *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de testes imunológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase pode contribuir para o esclarecimento dos diagnósticos clínicos e estudos soropidemiológicos (CONWAY *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1995a; COSTA-CRUZ, MACHADO, CAMPOS, 1998) e serem aplicados como alternativa diagnóstica.

A primeira abordagem do imunodiagnóstico na estrogiloidíase foi o teste cutâneo realizado com extratos de larvas filarióides descrito por Fuelleborni em 1926. Este teste surgiu na observação clínica de reações cutâneas (larva *currens* e urticária não específica) da doença, sugerindo a existência de resposta alérgica (hipersensibilidade) à larva filarióide que migra pela pele (PIRES & DREYER, 1993). Os testes intradérmicos não são convencionalmente aplicados (PELLEGRINO *et al.*, 1961).

A reação de imunofluorescência indireta com diversidade na sua padronização, tanto em relação aos antígenos de larvas filarióides utilizados como na execução da técnica ora em lâminas ora em tubos ou na detecção de

diferentes classes de imunoglobulinas tem sido realizada por diversos pesquisadores (COUDERT *et al.*, 1968; DAFALLA, 1972; GROVE & BLAIR, 1981; GENTA & WEIL, 1982; CAMPOS *et al.*, 1988; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

Outros métodos imunológicos têm sido descritos, como a aglutinação indireta com partículas de gelatina (SATO *et al.*, 1991), hemaglutinação indireta (GAM *et al.*, 1987), radioimunoensaio (IgE) (LEÃO *et al.*, 1980), reação de “Immunoblot” (GENTA *et al.*, 1988; LINDO *et al.*, 1994) e a reação imunoenzimática Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (BRASIL *et al.*, 1988; GAM *et al.*, 1987; LINDO *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995 a; COSTA-CRUZ *et al.*, 1998; COSTA-CRUZ *et al.*, 1999).

1.1. Resposta Imune Humoral na Estrongiloidíase e o Papel da Imunoglobulina A (IgA)

O reconhecimento do antígeno estranho é o ponto alto da resposta imune adaptativa específica e dois tipos distintos de moléculas estão envolvidas nesse processo. Os receptores de antígenos e as imunoglobulinas. Essas constituem um grupo de glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. Na maioria dos mamíferos superiores existem cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulinas e são designadas de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas diferem em tamanho, cargas elétricas, em composição de aminoácidos e no conteúdo de carboidratos. Além das diferenças entre classes, dentro de cada classe as imunoglobulinas também são muito heterogêneas (ROITT *et al.*, 1997).

O modelo estrutural de uma imunoglobulina baseia-se em dois tipos distintos de cadeias polipeptídicas. A cadeia menor (leve) possui um peso

molecular de 25000D e é comum à todas as classes, sendo que todas essas possuem uma região variável e uma constante, enquanto que a cadeia maior (pesada) possui um peso molecular de 50000-70000D e é estruturalmente diferente para cada classe ou subclasse. As cadeias polipeptídicas são unidas por forças covalentes e não covalentes (ROITT *et al.*, 1997).

A IgA presente nas secreções é chamada IgA secretória ou secretora e a IgA circulante na corrente sanguínea, IgA sérica (CHODIRKER & TOMASI, 1963).

A variação na estrutura da cadeia pesada de uma determinada classe origina subclasses das imunoglobulinas. Estas podem apresentar diferentes propriedades. A IgA secretora (sIgA), que tanto pode ser de uma subclasse (IgA1 ou IgA2) como de outra, existe especialmente na forma dimérica 11s, possui um peso molecular 385.000D e porcentagem de 7 a 11% de carboidratos. É abundante nas secreções mucosserosas onde associa-se com outra proteína conhecida como componente secretor. A subclasse IgA1 possui uma cadeia pesada $\alpha 1$ (alfa1), concentração sérica média de 3 mg/ml, coeficiente de sedimentação igual a 7s, peso molecular de 160×10^3 , meia vida de seis dias, porcentagem de distribuição intravascular de 42% e de 7 a 11% de carboidratos. A IgA2, possui as mesmas propriedades apresentando diferenças somente no tipo de cadeia pesada, $\alpha 2$ (alfa2), e uma concentração sérica média de 0,5mg/ml (ROITT *et al.*, 1997).

A síntese total de IgA sistêmica e secretória, segundo DELACROIX (1985), é de aproximadamente 66 mg/kg/dia, o que a coloca como imunoglobulina predominante, representando 60% do total de imunoglobulinas produzidas pelo organismo humano. A necessidade de síntese de grandes quantidades de IgA é compreensivo, pois as superfícies mucosas representam a maior área de contato do sistema imune com o meio externo, em que o microorganismos e seus produtos, substâncias presentes na alimentação ingerida

e no ar inalado, proporcionam uma fonte contante e potente de estimulação antigênica para ambos os compartimentos imunes, o secretor e o sistêmico (MESTECKY & MCGHEE, 1987).

O crescente interesse pela imunoglobulina A nas últimas décadas se deve a vários fatores, dentre os quais se sobressaem os seguintes: IgA é a principal classe de imunoglobulinas nas secreções externas (CHODIRKER & TOMASI, 1963); é a principal imunoglobulina produzida pelas células plasmáticas nas glândulas e membranas mucosas (TOMASI *et al.*, 1965; CRABBÉ *et al.*, 1965; RUBIN *et al.*, 1965); a IgA secretória (sIgA) tem características antigênicas e estruturais distintas da IgA sérica (HANSON, 1961; TOMASI *et al.*, 1965) em razão da presença do componente secretor (LAMM, 1976).

A descoberta por CHODIRKER & TOMASI (1963) de que a imunoglobulina A é a classe predominante nas secreções intestinais representou um dos maiores avanços no campo da imunologia intestinal. Os intestinos, com predomínio na lâmina própria, possuem o maior acúmulo de tecido linfóide do corpo (HEREMANS, 1974; LAMM, 1976; BRANDTZEG, 1985). O sistema imune no intestino tem um papel essencial na resistência do hospedeiro a bactérias, vírus e parasitos e na interação do hospedeiro com antígenos do ambiente e com os antígenos alimentares. O trato gastrointestinal humano contém tanto tecido linfóide quanto o baço (BRANDTZAEG *et al.*, 1989).

A descrição da IgA sérica e de algumas de suas propriedades por HEREMANS *et al.* (1959) foi o ponto de partida de outros estudos de vários autores (LAMM, 1976; KUTTEH *et al.*, 1982; DELACROIX, 1985; BRANDTZEG, 1985; MESTECKY *et al.*, 1986; CONLEY & DELACROIX, 1987). A IgA sérica apresenta uma parcela que varia de 10 a 15 % do total de imunoglobulinas circulantes. Sua produção diária pela medula óssea, baço e linfonodos é de 18,5 a 30 mg / kg / dia, quantidade inferior à IgA secretória produzida pelo trato gastrointestinal (HEREMANS, 1974). A maioria da IgA

sérica circulante (80 a 90 %) pertence à subclasse de IgA1, enquanto no trato intestinal predomina a subclasse de IgA2. A vida média da IgA sérica é de 3 a 6 dias (DELACROIX *et al.*, 1982; CONLEY & DELACROIX, 1987). Grande quantidade da IgA é produzida na medula óssea, mas o seu catabolismo relativamente rápido em relação à IgG resulta em baixos níveis séricos de IgA.

A função da IgA sérica humana permanece desconhecida. Embora seja capaz de neutralizar biologicamente antígenos ativos, admite-se que a IgA, diversamente da IgG ou IgM, não utiliza mecanismos auxiliares, tais como a fixação do complemento e a promoção de fagocitose (HEREMANS, 1974; MESTECKY *et al.*, 1986; KAGNOFF, 1993). Desde os trabalhos de GRABAR & WILLIAMS (1953), HEREMANS *et al.* (1959), CHODIRKER & TOMASI (1963), a IgA tem sido objeto de numerosas pesquisas relacionadas principalmente com a sua função nas secreções da mucosa gastrointestinal.

Para investigar a imunopatologia causada no tecido duodenal induzido por *estrongiloidíase* e para relatar o grau de severidade clínica são utilizados testes imunocitoquímicos para IgA e componente secretor (SC). A associação de IgA positiva no plasma celular com glândulas Brunner's e expressão de SC nessas glândulas sugerem que essas estruturas podem produzir um caminho à penetração da IgA no lúmen intestinal. A IgA positiva na lâmina celular aumenta proporcionalmente com a severidade dos sintomas. O aumento de secreção de IgA elucidada pela infecção requer o elevado número de células epiteliais capazes de transportar a IgA para dentro do lúmen do intestino (COUTINHO *et al.*, 1996).

O papel desempenhado pelas imunoglobulinas não está ainda completamente elucidado e explicado, e a resposta imunológica do tubo digestivo às infecções parasitárias, especialmente na *estrongiloidíase* não é bem conhecido. A imunidade humoral e celular de 35 pacientes com diferentes formas clínicas de *estrongiloidíase*, foi estudada por CARVALHO *et al.*,

(1983), demonstrando níveis baixos de IgG de eosinófilos no sangue periférico. A técnica de imunofluorescência direta utilizada para determinar as concentrações de IgA, IgG e IgM na mucosa jejunal de pacientes com diferentes formas clínicas de estrogiloidíase humana (assintomáticos, sintomáticos leves e sintomáticos graves), demonstrou diminuição significativa da concentração da IgA nos pacientes sintomáticos graves e diminuição da concentração de IgM nos três grupos, quando comparado com o grupo controle. Não havendo alterações na concentração de IgG (FOGAÇA *et al.*, 1990).

Concentrações de IgG, IgA, IgM e IgE no soro; e IgG, IgA e IgM no fluido duodenal e nas fezes foram determinadas por imunodifusão radial em 28 pacientes com estrogiloidíase; metade dos pacientes apresentaram elevados níveis de anticorpos IgE nos soros que variavam entre 810 a 14.600 unidades/ml com concentração média de 2.780 unidades/ml. Concentrações de IgG, IgA e IgM nos soros não apresentavam alterações significativas, embora, os valores médios de IgG e IgM tenham se mantido ligeiramente elevados e os de IgA ligeiramente diminuídos. Concentrações de IgG, IgA e IgM no fluido duodenal estavam nos limites normais; apenas IgA foi constantemente detectada, IgG e IgM foram detectadas em 18 e 26 pacientes, respectivamente. Nas fezes, a imunoglobulina mais freqüentemente detectada foi a IgA enquanto a IgG e IgM foram encontradas em apenas quatro pacientes (BEZJAK, 1975).

Níveis de IgE sérica total e anticorpos específicos IgG e IgA anti-*S. stercoralis* foram pesquisados, através de técnicas imunoenzimáticas, em 27 pacientes com estrogiloidíase comprovada por métodos parasitológicos. Manifestações clínicas nesta série de casos foram investigadas pelo estudo retrospectivo dos prontuários dos pacientes. Os níveis de IgE sérica foram elevados (maior do que 250UI/ml) em 59% dos pacientes (concentração média = 1364UI/ml). Anticorpos específicos IgG e IgA anti-*S. stercoralis* foram

detectados, respectivamente, em 23 (85,2%) e 21 (77,8%) pacientes (ROSSI *et al.*, 1993).

O teste ELISA tem sido usado para investigar presença de imunoglobulinas do soro (IgG1, IgG4, IgE e IgA) contra as larvas de *S. stercoralis*. Por este método pode-se observar a redução da resposta dos anticorpos específicos no soro para *S. stercoralis* em pacientes tratados corretamente com ivermectina, podendo ainda ser usado para calcular a eficácia deste quimioterápico no tratamento da estrogiloidíase endêmica (LINDO *et al.*, 1996).

No estudo realizado por ATKINS *et al.* (1997) em uma população endêmica de indivíduos infectados por *S. stercoralis* na Jamaica foi verificado que os níveis de IgG1 apresentaram-se inversamente correlacionados com a idade. Foi observado menor nível de IgE em grupos de idade avançada, enquanto que níveis de IgA foram similares em ambos os grupos endêmicos (velhos-30 a 80 anos e jovens-6 a 29 anos), mas foram elevados em indivíduos infectados cronicamente. Níveis de IgG4 apresentaram-se similares e elevados em todos os grupos estudados. O estudo sugeriu que a idade está correlacionada com a infecção crônica por *S. stercoralis* em área endêmica. Elevada regulação de IgG4 precocemente pode facilitar a estabilização da infecção e, em combinação com o desenvolvimento de IgE de baixa resposta, pode promover estrogiloidíase crônica assintomática. A elevada produção de IgA pode estar envolvida no controle da infecção crônica, pois interfere na redução da produção da IgG1.

1.2. Antígeno Heterólogo

Uma das principais limitações encontradas no desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos, é a dificuldade em se obter quantidades

suficientes de antígenos que permitam seu posterior fracionamento e análise (ROSSI *et al.*, 1993b). Diante disto, é conveniente a padronização e utilização de antígenos provenientes de *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925). *S. ratti* é um helminto de ratos silvestres que infecta facilmente o rato branco e pode ser mantido em laboratório sem dificuldades. Larvas filarióides podem ser obtidas em grande número a partir de culturas de fezes de ratos infectados, o que simplifica a obtenção do antígeno (PELLEGRINO *et al.*, 1961).

O Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia desenvolve desde de 1994 a linha de pesquisa denominada “Diagnóstico da Estrongiloidíase Humana”, tendo realizado a padronização da detecção de IgG e IgM pelas reações de Imunofluorescência Indireta com antígeno homólogo e heterólogo e ELISA com antígeno heterólogo.

2. OBJETIVOS

- Obter as formas larvárias de *S. ratti*.
- Produzir extratos salino e alcalino total de *S. ratti* para reação ELISA.
- Obter amostras de soros controles e de pacientes com estrogiloidíase.
- Padronizar o teste imunoenzimático ELISA para detecção de IgA circulante frente antígenos salino e alcalino de *S. ratti*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de *Strongyloides ratti*

Para obtenção de *Strongyloides ratti*, foram utilizadas fezes de ratos da espécie *Rattus rattus* mantidos infectados por inoculação em laboratório.

Os animais, após 10 dias de inoculação, foram colocados em gaiolas metálicas, forradas com papel umedecido em água, para permanecerem por uma noite em defecação. Após este período, fez-se a colheita das fezes para proceder o cultivo pelo método de Looss. No 5º dia, foram obtidas as larvas pelo método de Baermann-Moraes, sendo o material concentrado através de centrifugação. Foi feita a contagem das larvas em 10µl deste concentrado em 3 lâminas distintas e através da média entre as 3 lâminas, verificou-se a quantidade de larvas existentes em 1 ml.

O inóculo foi feito por via subcutânea no volume de 1 ml da suspensão de 2000 larvas por rato. Após inoculação, os ratos permaneceram 10 dias até as próximas culturas.

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

2.1.1 Método de Looss

Para 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 uma camada não espessa, que permaneceu em repouso à temperatura de 25°C em estufa BOD por 5 dias. Após este procedimento foram recolhidas as larvas pelo método de Baermann-Moraes (NEVES *et al.*, 1995).

3.1.2. Método de Baermann-Moraes

Em um suporte de madeira foram colocados funis de vidro com diâmetro de 11,5 cm, cuja haste continua em um tubo de borracha de 10 cm, no qual foi introduzido um tubo de ensaio de 10 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, obliterando-se a passagem de água.

Cada funil foi preenchido até a borda com água de torneira a temperatura de 45°C. Sobre o mesmo foi colocada uma tela metálica com 100 malhas por cm². Sobre a tela foi colocada gaze dobrada em quatro, depositando-se sobre a mesma aproximadamente 10g de fezes. A gaze com a amostra fecal foi deixada em contato com a água, em repouso por uma hora e foi retirado o tubo de ensaio com cerca de 5 a 7 ml de água.

Após concentração em centrífuga Excelsa Baby I FANEM São Paulo-Brasil a 1500 rpm por 15 minutos as larvas foram lavadas em tampão fosfato pH 7,2 por centrifugação a 1500 rpm durante 3 minutos por 5 vezes e conservadas a - 20°C até o momento do uso (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948).

3.2. Produção de Extratos Antigênicos Solúveis para o Teste ELISA

3.2.1 Produção de Extrato Salino Total de Antígeno de *S. rattii*

As larvas de *S. rattii* obtidas no item 3.1 foram descongeladas e ressuspensas em 3 ml de solução salina tamponada com fosfato 0,15M pH 7,2 (PBS). As mesmas foram rompidas, para extração protéica com auxílio de um homogeneizador de tecidos a 4°C (GLAS-COL), e posteriormente através de passagem por ultra som (Thorton, Inpec Eletrônica São Paulo) a 40 khz em 7 períodos de 20 segundos em banho de gelo. O material foi deixado sob agitação por 18 horas à 4°C para extração dos antígenos e centrifugado a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.2.2. Produção de Extrato Alcalino de *S. rattii*

Às larvas de *S. rattii* foram adicionadas 1 ml de NaOH (0,15M) deixando-as por seis horas a 4°C sob agitação lenta. Após agitação, foi colocado 0,5 ml de HCl (0,3M) gotejando-se e medindo o pH com a utilização do papel indicador considerando aproximadamente o pH de 7,0 até 7,5, seguindo à centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5C plus, USA). O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.3. Amostras de Soros

Foram colhidos 10 ml de sangue de indivíduos no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU por punção venosa e encaminhados ao Laboratório da Disciplina de Parasitologia para obtenção dos soros por centrifugação. Os soros foram armazenados a - 20°C até o momento do uso.

Para colheita do material fecal e do sangue de pacientes com outras parasitoses e pacientes com estrogiloidíase foi elaborado um termo de consentimento (anexo 1), no qual os pacientes ou responsáveis declararam estar cientes dos objetivos do trabalho, bem como da importância de sua colaboração para o mesmo.

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

3.3.1. Amostras de Soros Controles de Indivíduos Sadios

Foram obtidos por doação à disciplina de Parasitologia 60 amostras de soros controles de indivíduos sadios (estudantes universitários), que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917 & MORAES, 1948) e Hoffmann, Pons e Janer (HPJ) (HOFFMANN, PONS & JANER, 1934) não foram detectadas larvas de *S. stercoralis* ou outra parasitose e que negaram história anterior de estrogiloidíase. O primeiro método foi realizado segundo descrito anteriormente no item 3.1.2, recolhendo-se 5 ml de água do tubo de ensaio. O

tubo foi calibrado utilizando-se balança e centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.

Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado deixando no tubo aproximadamente 1 ml de líquido para ser examinado. Foram adicionadas três gotas de lugol (1 g de Iodo em 100 ml de água destilada e 10 g de Iodeto de Potássio) com a finalidade de imobilizar as possíveis larvas existentes, impedindo sua migração pela parede do tubo e evitando a contaminação do manipulador do material. Para conservar as estruturas destas larvas foram adicionadas também três gotas de formol a 10%.

Sobre uma lâmina de 7,5 cm de comprimento por 2,5 cm de largura foram colocadas duas gotas do sedimento e cobertos com lamínulas de 24mm x 24mm. As lâminas foram observadas em microscópio óptico binocular (OLYMPUS - CH2), em aumentos de 100 e 400 vezes. O segundo método foi realizado conforme descrito abaixo.

Método de HOFFMANN, PONS & 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 6g de fezes, que foram fragmentadas na água por meio de bastão de vidro. Acrescentou-se mais água, no volume de cerca de 15 ml agitando-se a suspensão, a qual foi filtrada, através de gaze cirúrgica dobrada quatro vezes, sobre tela metálica com 200 malhas por cm², sendo material filtrado coletado em cálice cônico de sedimentação com 200 ml de

capacidade. Os detritos retidos na gaze foram lavados com água corrente, agitados constantemente com o bastão de vidro, no mesmo cálice.

A suspensão assim preparada foi deixada em repouso durante 24 horas. Quando o sobrenadante estava turvo, este foi descartado cuidadosamente sem levantar ou perder o sedimento. Em seguida o sedimento foi novamente ressuspensão, sendo o volume completado com água e deixado em repouso por duas horas, período após o qual, descartou-se o sobrenadante, deixando no recipiente o sedimento para leitura. Foram preparadas 3 lâminas para cada amostra fecal. Em caso de amostra negativa, foram preparadas mais duas lâminas para confirmação do resultado.

Do sedimento foram colhidas duas gotas com auxílio de pipeta, as quais foram colocadas sobre lâminas de 7,5 cm de comprimento por 2,5 cm de largura, adicionando-se uma gota de lugol, homogeneizando, cobrindo com lamínula de vidro (24mm x 24mm) e examinadas em microscópio ótico binocular (OLYMPUS - CH2) com objetiva em aumento de 10 e 40 vezes.

3.3.2. Amostras de Soros de Pacientes com Outras Parasitoses

Com o objetivo de verificar reatividade cruzada com outras parasitoses, nos métodos imunológicos, foram estudados 65 soros de indivíduos com outras parasitoses: *Ancilostomídeos* (8); *Enterobius vermicularis* (7); *Hymenolepis nana* (6); *Trichuris trichiura* (6); *Ascaris lumbricoides* (5); *Taenia* sp (2); *Giardia lamblia* (16); *Entamoeba histolytica* (2), *Shistosoma mansoni* (1). Sendo encontrados 11 casos de indivíduos biparasitados e um poliparasitados. Todos foram triados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU pelo método de MIFC.

3.3.3. Amostras de Soros de Pacientes com Estrongiloidíase

Foram obtidos 61 amostras de soros de indivíduos com diagnóstico comprovado da parasitose através da identificação de larvas de *S. stercoralis* no material fecal pelo método de MIFC realizado como rotina parasitológica no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

3.3.4. Amostras de Soros Padrão Positivo e Negativos

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

O três soros padrões negativos foram constituídos de amostras de soros de indivíduos sadios, 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 estrongiloidíase.

3.4. Padronização do teste ELISA frente aos antígenos salino e alcalino

3.4.1. Determinação da concentração dos antígenos e titulação do conjugado imunoenzimático-IgA

Os antígenos salino e alcalino foram analisados pelo teste imunoenzimático ELISA isoladamente no mesmo dia e hora, nas concentrações de 10µg/ml, 20µg/ml e 40µg/ml. Utilizou-se soro padrão positivo e negativo na diluição 1:20 em PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato) pH 7.2 contendo Tween 20 (SIGMA, USA) a 0,05% (PBS-T), controles contendo PBS-T frente às diferentes concentrações dos antígenos e PBS-T na ausência de antígenos na placa. O conjugado IgA específica de cabra anti-IgA humana peroxidase (SIGMA-USA) foi diluído a 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 em PBS-T.

3.4.2. Teste imunoenzimático ELISA

Foram empregadas placas de poliestireno como suporte para adsorção de 50µl de cada um dos antígenos solúveis de *S. rattii* na concentração ideal determinada no item 3.4.1., isoladamente. As placas foram encubadas a 4°C durante 18h em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M pH 9,6). Após este período e três lavagens de cinco minutos com PBS, pH 7,2 contendo Tween 20 (SIGMA, USA- cadeia α) a 0,05% foram adicionados 50 µl de amostras de soros um padrão positivo e três negativo e soros sendo testados na diluição 1:20 para triagem; diluídos na razão dois na posterior titulação. Após incubação por 45 minutos, em câmara úmida a 37°C e três lavagens de cinco minutos com PBS-Tween foram adicionados 50 µl de conjugado IgA de cabra anti-IgA humana marcado com peroxidase (SIGMA-USA), no título ótimo determinado, por um período de 45 minutos a 37°C. Após três lavagens a reação foi revelada pela adição de 50 µl do substrato H₂O₂ em solução de ortofenileno diamina (OPD), preparado no momento do uso (5 mg de OPD + 12,5ml de tampão

citrato fosfato pH 5,0 + 10 µl de H₂O₂ 30%). Após 15 minutos à 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 490 nm em leitor de ELISA (Metrolab, Argentina).

O limiar da reatividade foi determinado pela média aritmética das densidades ópticas das amostras dos soros padrões negativos acrescidos de dois desvios padrões (BASSI *et al.*, 1991).

3.5. Análise Estatística

Foi utilizado teste de distribuição Binomial para diferença entre duas proporções ao nível de significância de 5% para comparação da reação imunoenzimática ELISA frente aos antígenos salino e alcalino (SPIEGEL, 1994).

3.6. Normas de Biossegurança

Todo 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, segundo CHAVES-BORGES & MINEO, (1997).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de *Strongyloides ratti*

Através do método de Baermann-Moraes obteve-se 210.000 larvas filarióides de *S. ratti* resultantes da cultura de fezes de *Rattus rattus* mantidos em laboratório.

4.2. Produção de antígenos para o teste ELISA

4.2.1. Produção de extratos antigênicos solúveis para teste ELISA

O número de larvas utilizadas para obtenção de extratos salino e alcalino de *S. ratti*, as dosagens protéicas pelo método de Lowry e o rendimento em mililitros estão apresentados na Tabela 1.

4.3. Padronização do teste imunoenzimático ELISA frente aos dois antígenos de *S. ratti*

Os testes ELISA utilizando extrato salino e alcalino de *S. ratti*, realizados para detecção de anticorpo IgA apresentaram resultados satisfatórios com os padrões positivo e negativo reagentes e não reagentes, respectivamente.

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

A concentração de 10 µg/ml foi escolhida para sensibilização das placas para os dois antígenos. O título ideal do conjugado foi determinado como 1000 para os dois extratos.

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam, respectivamente, a identificação dos 60 indivíduos sadios, 65 com outras parasitoses e 61 com estrogiloidíase, quanto ao sexo, idade, sintomas, presença ou não de parasitos e outras infecções e o resultado dos testes imunológicos.

A Tabela 5 demonstra a distribuição da freqüência dos títulos de anticorpos IgA detectados pelo teste ELISA frente aos dois extratos antigênicos de *S. ratti* nos 186 soros testados. Os títulos dos soros reagentes variaram de 20 a 320 e de 20 a 160, respectivamente, na detecção de IgA específica frente aos extratos salino e alcalino de *S. ratti*. Pelos resultados obtidos foi necessário determinar o corte da reação no título \geq a 20. O teste ELISA possibilitou detectar anticorpos circulantes em 26 (42,62%) e 29 (47,54%) dos pacientes com estrogiloidíase quando se utilizou respectivamente, os extratos salino e alcalino de *S. ratti*, onde não houve diferença significativa entre essas duas proporções com margem de erro de 5%. A Figura 3 demonstra a freqüência de reatividade dos títulos de anticorpos IgA detectados pela reação imunoenzimática ELISA frente aos extratos salino e alcalino.

Entre os 61 casos de estrogiloidíase, 35 (57,37%) pacientes mostraram título menor que 20 na reação com extrato salino. Destes, 19 (31,14%) estavam negativos para outros parasitos, ou não apresentavam outras infecções; sete (11,47%) pacientes estavam positivos para outros parasitas e negativos para outras infecções e seis (9,83%) estavam negativos para outras parasitoses e apresentavam outras infecções por *T. gondii*, *T. cruzi*, *S. mansoni*; três (4,91%) pacientes apresentavam infecção por toxoplasmose, e estavam parasitados por *E. histolytica* e *E. coli* (Tabela 4).

No extrato alcalino dos 61 casos de estrogiloidíase estudados 32 (52,45%) pacientes mostraram títulos menores que 20. Destes, 18 (29,50%) pacientes estavam negativos para outros parasitas e não apresentavam outras infecções; sete (11,47%) estavam positivos para outros parasitas e negativos para outras infecções; quatro (6,55%) estavam negativos para outros parasitas e apresentavam infecção por toxoplasmose e esquistossomose e três (4,91%) pacientes apresentaram outros parasitas e infecção por toxoplasmose (Tabela 4).

Dos 125 soros controles, ocorreram três casos (2,4%) de positividade frente aos dois extratos antigênicos pertencentes a um paciente portador de *Enterobius vermicularis* os outros dois, positivos para ancilostomídeo. Três (2,4%) casos de pacientes parasitados por *E. histolytica*, ancilostomídeos e *A. lumbricoides* tiveram título igual a 20, todos no extrato alcalino (Tabela 3).

Tabela 1: Determinação da concentração de proteínas e rendimento em ml dos extratos antigênicos salino total e alcalino de *S. ratti*.

Extrato antigênico <i>S. ratti</i>	Número de larvas	Proteínas $\mu\text{g/ml}$	Volume obtido (ml)	Rendimento ng
Salino	110.000	260	2	4,7
Alcalino	100.000	700	1,6	11,2

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

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

Tabela 3 - Identificação dos 65 indivíduos controles com outras parasitoses segundo sexo, idade e sintomas e resultados dos testes imunológicos para detecção de IgA na estrogiloidíase.

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

Tabela 4 - Identificação dos 61 casos de paciente com diagnóstico de *S. stercoralis* nas fezes segundo sexo, idade, sintomas, presença ou não de outros parasitas ou infecções e resultado ELISA-IgA.

CASO	SIGLA	SEX.	IDADE (ANOS)	SINTOMAS	MIFC PARA OUTROS PARASITAS / INFEC.	ELISA	
						S	A
1	JP	M	41	Diarréia e dor abdominal			
2	CGA	F	18	Pré-natal	negativo	20	80
3	ELS	M	16	Cefaléia moderada	<i>E. hartmanni</i>	neg	neg
4	CCP	F	18	Pré-natal	negativo	neg	neg
5	MNS	F	40	Diagnóstico GO preventivo	Negativo / toxoplasmose	neg	neg
6	CAS	M	8	Dor abdominal	<i>E. coli</i> ; <i>E. histolytica</i>	80	160
7	LAM	F	17	Pré-natal	<i>S. mansoni</i>	neg	neg
8	IDF	M	57	Alcólatra crônico, anemia, emagrecimento	Negativo / toxoplasmose	neg	neg
9	VLS	M	24	Diarréia e vômitos	negativo	40	40
10	JFC	M	47	Alcólatra crônico, astenia e anemia	negativo	neg	20
11	CBG	M	26	Cefaléia, diarréia, astenia e tosse seca	negativo	neg	neg
12	SMB	F	18	Pré-natal	<i>E. coli</i> ; <i>E. histolytica</i>	neg	neg
13	VDS	F	38	Pré-natal	<i>E. histolytica</i> / toxoplasmose	neg	neg
14	SSB	F	14	Diarréia	negativo	neg	neg
15	HLS	M	34	Epigastralgia	negativo	neg	neg
16	ACV	M	48	Epigastralgia	negativo	neg	neg
17	MEG	F	18	Cefaléia	Negativo / D. de Chagas	40	40
18	JES	F	24	Pré-natal	negativo	neg	neg
19	ABB	M	41	Diarréia	Negativo / toxoplasmose	20	20
20	UCP	M	52	Dor lombar em cólica	negativo	neg	neg
21	LAN	M	26	Assintomático	<i>H. nana</i>	20	20
22	GFS	M	60	Dor abdominal e diarréia	negativo	40	20
23	IFS	F	48	Dor abdominal e inapetência	negativo	20	20
24	MSA	F	4	Dor abdominal	<i>E. coli</i> / neurocisticercose	20	40
25	LCRV	F	5	Epigastralgia	<i>G. lamblia</i>	neg	neg
26	BPB	F	4	Palidez e astenia	negativo	neg	neg
27	AMM	M	18	Diarréia	negativo	neg	neg
28	VOO	M	33	Dispneia	<i>E. coli</i>	20	neg
29	TRL	F	34	Pré-natal	negativo	20	20
30	MFS	M	55	Epigastralgia e anemia	<i>E. coli</i> ; <i>E. histolytica</i>	neg	neg
31	JSA	M	57	Dor abdominal	negativo	neg	neg
32	SAM	M	80	Sintomas dispépticos	Negativo / esquistossomose	neg	neg
33	JAS	M	41	Diarréia esporádica	<i>E. hartmanni</i>	320	160
34	LRS	F	10	Astenia	negativo	neg	neg
35	MSC	F	26	Pré-natal	<i>G. lamblia</i>	neg	neg
36	MMO	M	50	Diarréia e epigastralgia	negativo	40	80
37	CR	M	20	Assintomático	Negativo / esquistossomose	neg	neg
38	EPC	M	46	Epigastralgia	negativo	160	40
39	LSM	F	17	Pré-natal	Negativo / D. de Chagas	neg	40
40	JAS	M	73	Dor abdominal	negativo / rubéola	20	20
41	SP	F	19	Epigastralgia	negativo	80	80
42	CH	F	29	Pré-natal	negativo	neg	neg
43	LEM	F	47	Astenia e diarréia	Negativo / toxoplasmose	neg	20
44	EVCA	F	31	Epigastralgia	negativo	neg	neg
45	AEC	M	40	Dor abdominal	negativo	20	40
46	DGF	F	39	P ^{cte} renal crônica	<i>E. coli</i> ; <i>E. histolytica</i>	20	20
47	NPS	M	14	Anemia	<i>E. coli</i> / toxoplasmose	neg	neg
48	DF	F	38	Pré-natal	negativo	neg	neg
49	MCFC	F	25	Diarréia e dor abdominal	<i>G. lamblia</i> / toxoplasmose	neg	neg
50	RGB	M	33	Diarréia e dor abdominal	negativo	neg	neg
51	JLB	M	44	Epigastralgia	negativo	80	80
52	ESS	M	37	Sintomas dispépticos	<i>E. coli</i> ; <i>E. histolytica</i>	20	80
53	LPRO	F	61	Emagrecimento e polifagia	negativo	neg	20
54	GGR	M	24	Assintomático	negativo	160	80
55	CRA	F	39	Epigastralgia	negativo	20	neg
56	RAM	M	57	Eritroderma esfoliativo e prurido	negativo	neg	20
57	VPB	F	46	Anemia macrocítica	negativo	80	20
58	DFS	F	41	Dor abdominal	negativo	160	80
59	MALM	F	25	Pré-natal	negativo	neg	neg
60	DAT	F	09	Dor abdominal e prurido	negativo	40	40
61	DV	F	69	Assintomática	negativo	neg	neg
					negativo	160	160

Tabela 5 – Distribuição de títulos de anticorpos IgA específicos detectados pelo teste ELISA frente aos extratos antigênicos salino e alcalino de *S. ratti* em 61 amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase e 125 amostra de soros controle

Título de IgA – extrato salino									
Soros	n	< 20	20	40	80	160	320	Total +	
								n	%
<i>S. stercoralis</i>	61	35	12	5	4	4	1	26	42,62
Controles parasitados	65	62	2	-	1	-	-	3	4,62
Controles sadios	60	-	-	-	-	-	-	0	0,0

Título de IgA – extrato alcalino									
Soros	n	< 20	20	40	80	160	320	Total +	
								n	%
<i>S. stercoralis</i>	61	32	12	7	7	3	-	29	47,54
Controles parasitados	65	59	4	1	1	-	-	6	9,23
Controles sadios	60	60	-	-	-	-	-	0	0,0

Teste de distribuição Binomial para diferença entre duas Proporções Significante com erro máximo de 5% ($p > 0,05$).

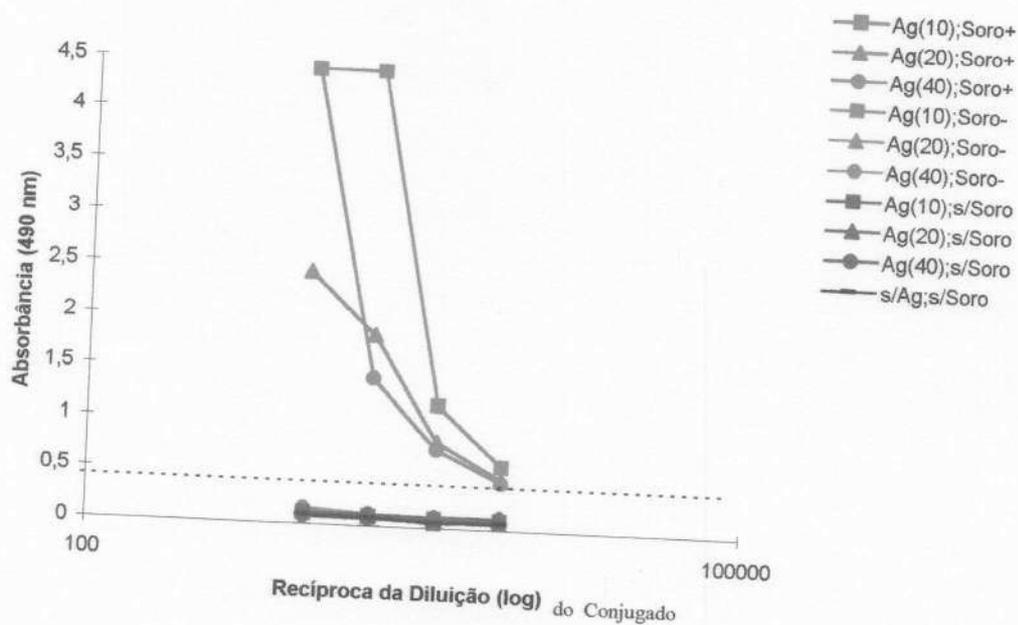


Fig. 1 - Curvas de reatividade logarítmica do teste ELISA utilizando extrato salino de *Strongyloides ratti* na concentração de 10, 20, 40µg/ml frente a uma amostra de soro padrão positivo (Soro+) e uma amostra padrão negativo (Soro-) diluídos 1:20 e controle sem amostra de soro (s/ Soro) e sem antígeno e sem soro (s/Ag; s/soro) empregando-se conjugado IgA de cabra anti-IgA humana (cadeia α) peroxidase nas diluições de 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000. Limiar de reatividade da reação calculado em 0,490 DO para as três concentrações do extrato

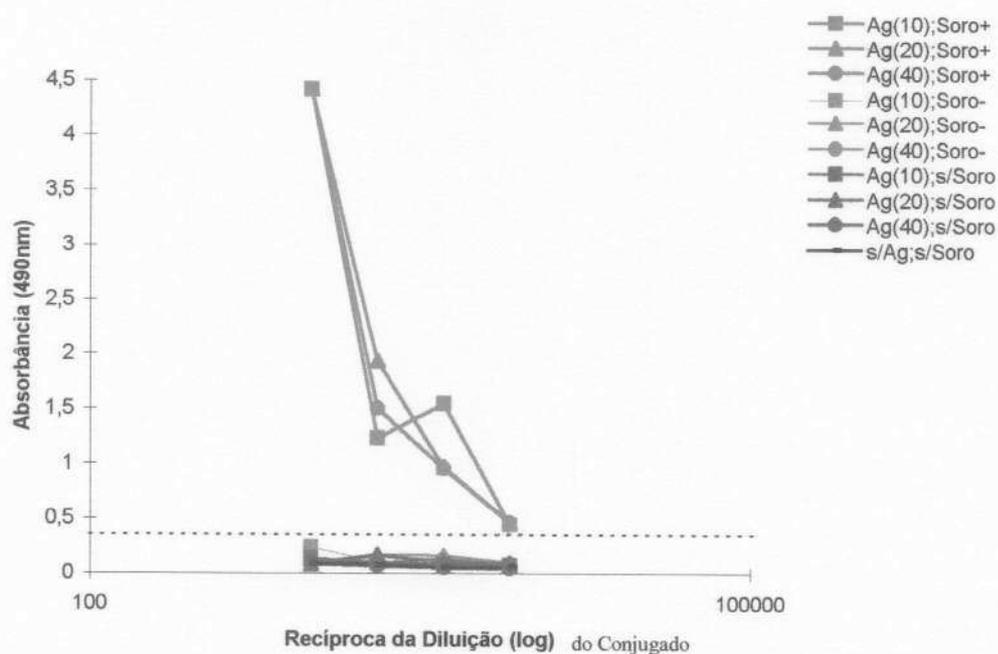


Fig. 2- Curvas de reatividade logarítmica do teste ELISA utilizando extrato alcalino de *Strongyloides ratti* na concentração de 10, 20, 40 μ g/ml frente a uma amostra de soro padrão positivo (Soro+) e uma amostra padrão negativo (Soro-) diluídos 1:20 e controle sem amostra de soro (s/ Soro) e sem antígeno e sem soro (s/Ag; s/soro) empregando-se conjugado IgA de cabra anti-IgA humana (cadeia α) peroxidase nas diluições de 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000. Limiar de reatividade da reação calculado em 0,490 DO para as três concentrações do extrato

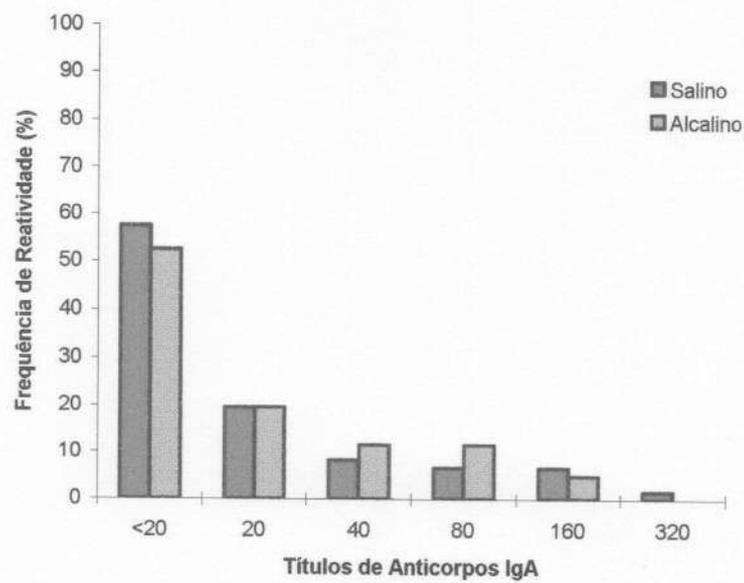


Fig. 3- Frequência de reatividade dos títulos de anticorpos IgA detectados pela reação imunoenzimática ELISA frente aos extratos salino e alcalino de *Strongyloides ratti* em 61 amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase.

5. DISCUSSÃO

O estudo da IgA em infecções parasitárias humanas tem recebido pouca atenção, e na estrogiloidíase também os trabalhos são escassos.

A obtenção de larvas de *S. stercoralis* foi um fator limitante para o desenvolvimento dos testes, pois são necessárias no mínimo 100.000 larvas para produção de extratos específicos, sendo empregado portanto, para este trabalho o antígeno heterólogo (*S. ratti*), que possibilitou a produção dos dois extratos antigênicos (salino e alcalino) utilizados.

Até o momento, o teste ELISA-IgA foi realizado somente com extrato salino para a detecção de diferentes classes de imunoglobulinas nos soros humanos de indivíduos infectados pelo *S. stercoralis* sendo, portanto, o emprego do extrato alcalino para detecção de IgA e com antígeno heterólogo de *S. ratti* um trabalho pioneiro, funcionando como apoio laboratorial para o diagnóstico da estrogiloidíase humana.

Esse estudo possibilitou a detecção de anticorpos IgA específica anti *S. stercoralis* em 26 indivíduos (42,62%) para o extrato salino e em 29 indivíduos (47,54%) para extrato alcalino. O teste ELISA não detectou anticorpos IgA específica em 35 indivíduos (57,38%) para o extrato salino e 32 (52,46%) para o extrato alcalino sendo considerado "cut off" igual ou superior a 20 para ambos extratos.

Trabalhos para detecção de anticorpos IgA específica anti *S. stercoralis* obtiveram positividade de 89,5% para teste ELISA em pacientes imunocomprometidos e com história geográfica comum (GENTA *et al.*, 1988). Da mesma forma, foi encontrado positividade de 87,5% em indivíduos imunocompetentes com estrogiloidíase crônica e de 73% em pacientes imunocomprometidos em trabalho realizado por GENTA *et al.* (1987) de respectivamente, 104 e 15 indivíduos com diferentes formas de estrogiloidíase e curso clínico de infecção.

Estudo realizado por ROSSI *et al.* (1993), demonstrou a frequência de 77,8% de positividade para IgA em pacientes com diagnóstico comprovado para estrogiloidíase, 33% dos pacientes com sorologia negativa para o anticorpo IgA específica estavam em curso de terapia imunossupressiva.

A menor frequência de detecção de IgA específica no presente trabalho, comparados à literatura pode ser atribuída à diferença na diluição dos soros que foi de 1:20 enquanto alguns autores como GENTA *et al.* (1987), GENTA *et al.* (1988) e ROSSI *et al.* (1993), utilizaram 1:8, o que poderia ser aumentar o grau de especificidade no presente estudo, como também pela heterogeneidade dos indivíduos, ou provavelmente por estarem na fase crônica da doença, apesar dos 61 indivíduos estarem eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes.

Os resultados encontrados também diferem das observações realizadas por ATKINS *et al.* (1997) onde detectaram níveis elevados de IgA em indivíduos infectados cronicamente em área endêmica.

No trabalho, as reações cruzadas (extrato salino) eram de dois pacientes com ancilostomíase e o outro caso foi de infecção por *Enterobius vermicularis* diagnosticado em uma paciente do sexo feminino de 23 anos de idade em período gestacional, não sendo possível confirmação parasitológica da presença de *S. stercoralis*.

No extrato alcalino observou-se seis casos de reações cruzadas, estando quatro pacientes positivos para ancilostomídeos, um para *E. histolytica* e um

paciente com *E. vermicularis*. Cabe ressaltar que os dois testes imunológicos para estrogiloidíase foram considerados reagentes no título igual ou maior que 20.

Apesar do extrato alcalino apresentar maior índice de reatividade que o extrato salino, essa diferença não foi significativa, portanto, ambos são recomendados.

No grupo controle de pacientes sadios, não houve detecção de IgA específica anti- *S. stercoralis*, situação encontrada em outros trabalhos como os GENTA *et al* (1987) em 50 indivíduos saudáveis norte-americanos.

O extrato alcalino apresentou maior rendimento na dosagem de proteínas em relação à quantidade de larvas utilizadas. Apesar de não haver diferença significativa entre as duas proporções de IgA frente aos extratos, no teste ELISA, pode-se considerar o extrato alcalino mais prático que o salino, podendo ser utilizado em estudos individuais ou epidemiológicos da estrogiloidíase humana.

6. CONCLUSÕES:

Este trabalho permite concluir que :

- Padronizou-se pela primeira vez no Brasil o teste ELISA-IgA específica com antígeno heterólogo (*S. ratti*) para o diagnóstico da estrogiloidíase humana.
- Em relação à praticidade de preparo e rendimento na dosagem de proteínas obtido, o extrato alcalino de *S. ratti* se mostrou mais prático que o salino.
- O teste imunoenzimático ELISA com extratos salino e alcalino são recomendados para auxiliar no diagnóstico da estrogiloidíase humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ARAKAKI, T. *et al.* Efficacy of agar plate culture in detection of *S. stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.76, p.425-428, 1990.
- ASSEFA, T. *et al.* Evaluation of the modified Baermann's method in the laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **Ethiop. Med. J.**, v.29, p.193-198, 1991.
- ATKINS, N. S. *et al.* Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.91, p.609-613, 1997.
- 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.
- BAERMANN, G. T. Eine einfache methode zur auffindug von ankylostomun (nematoden): larven in erdproben - mededesle geesk. **Laborat. Weltever Fostbundel.**, p.41-47, 1917.

*Segundo normas da Segundo normas da ABNT
NBR 6023/89

- BARNISH, G.; ASHFORD, R.W. *Strongyloides fuelleborni* in Papua New Guinea: epidemiology in an isolated community and result of an intervention study. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.83, n.5, p.499-506, 1989.
- BASSI, G. E. *et al.* A reação imunoenzimática pra cistircercose no líquido cefalorraquidiano – considerações sobre o limiar de reatividade. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 27, p. 49-52, 1991.
- BEAL, C.B. *et al.* A new technique for sampling duodenal contents: demonstration of upper small bowll pathogens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.19, p.349-352, 1970.
- BEZJAK, B. Immunoglobulin studies in strongyloidiasis with special reference to raised serum IgE levels. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.24, p.945-948, 1975.
- BRANDTZEG, P. The role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulin in man. **Scand. J. Immunol.**, v.22, p.111, 1985.
- BRADTZAEG, P. *et al.* Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepitelial lynfocites. **Gastroenterology**, v.97, p.1562-1584, 1989.
- BRASIL, R. *et al.* Diagnóstico sorológico da estrogiloidíase humana pelo método imunoenzimático ELISA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.21, n. 3, 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.

- CAMPOS, D. M. B. *et al.* Antígeno de *Strongyloides cebus* (DARLING, 1911) no diagnóstico de estrogiloidíase humana. **Rev. Pat. Trop.**, v.17, p.17-23, 1988.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Immunological features in different clinical forms of strongyloidiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 346-349, 1983.
- 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 *S. stercoralis* infection. **Endoscopy**, v.26, p.272, 1994.
- CHODIRKER, W.B. & TOMASI, T. B. Gamma-globulin. Quantitative Relationships in human serum and nonvascular fluids. **Science**, v.142, p.1080-1081, 1963.
- CONLEY, M. E. & DELACROIX, D.L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? **Ann. Intern. Med.** V.106, n.6, p.892-899, 1987.
- CONWAY, D. J. *et al.* Towards effective control of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitol. Today**, v.11. n.11, p.420-423, 1995.
- COSTA-CRUZ, J. M. *et al.* Ocorrência de estrogiloidíase em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 14., Goiânia, GO. **Resumos...** p.269, 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, n. 6, p. 313-317, 1997.
- COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected on filter paper, in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.40, n. 5, p.329-331, 1998.
- COSTA-CRUZ, J. M. *et al.* Padronização do teste ELISA utilizando extratos de *Strongyloides ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana. In: SEMANA CIENTÍFICA DA MEDICINA, 11., Uberlândia. Anais... Uberlândia: UFU, 1998, p.21.
- COSTA-CRUZ, J. M. *et al.* Padronização do teste ELISA para a detecção de anticorpos IgM, utilizando extrato salino e alcalino de *Strongyloides ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32 (suplemento 1), p.299, 1999.
- COUDERT, J. *et al.* Diagnostic sérologique de l'anguillulose humaine par immunofluorescence (resultats preliminaires). **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.61, p.74-80, 1968.
- COUTINHO, H. B. *et al.* Immunocytochemistry of mucosal changes in patients infected with the intestinal nematode *Strongyloides stercoralis*. **J. Clin. Pathol.**, v.49, p.717-720, 1996.

- CRABBÉ, P. A. *et al.* The normal human intestinal mucosa as a major source of plasma cells containing γ -A-immunoglobulin. **Lab. Invest.**, v.14, p.235-248, 1965.
- DAFALLA, A. A. The indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.75, p.109-111, 1972.
- DELACROIX, D.L. *et al.* IgA subclasses in various secretions and in serum. **Immunology**, v.47, p.383-385, 1982.
- DELACROIX, D. L. L'immunoglobuline A en 1985. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v.9, p.603-606, 1985.
- DREYER, G. *et al.* Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implication for diagnosis and clinical trials. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.2569-2571, 1996.
- FERREIRA, M. S. *et al.* Strongyloidiasis and infection due to human Immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian teaching hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 154-155, 1999.
- FOGAÇA, H. S. *et al.* Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrogiloidíase. **F. Med.**, v.100, p.229-235, 1990.
- GAM, A. A. *et al.* Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.37, n.1, p.157-161, 1987.

- GENTA, R. M.; WEIL, G. J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Lab. Invest.**, v.47, n.1, p.87-90, 1982.
- GENTA, R. M. *et al.* Demonstration and partial characterization of parasite-specific immunoglobulin A responses in human strongyloidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, n.8, p. 1505-1510, 1987.
- GENTA, R. M. *et al.* Endemic Strongyloidiasis in northern Italy: Clinical and Immunological aspects. **Quart. J. Med.**, v.28, p. 679-690, 1988.
- GOMES, M. C. **Mecanismos patológicos relacionados a auto-endo-infecção na estrogiloidose humana fatal.** Salvador: Universidade Federal da Bahia. Centro Editorial e Didático, 1981. 35p. il.
- GOMES-MORALES, M. A. *et al.* Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV- positive and negative patients with diarrhoea in Tanzânia. **Trop. Med. Parasitol.**, v.46, n.2, p.109-114, 1995.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.10, p.193-194, 1953.
- GRANOT, E. *et al.* Strongyloidiasis in infancy: case report and review. **Isr. J. Med. Sci.**, v.19, p.1089-1093, 1983.
- 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* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Lab. Invest.**, v.47, n.1, p.87-90, 1981.
- HALL, A. *et al.* *Strongyloides stercoralis* in an urban slum community in Bangladesh: factors independently associated with infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.88, n.5, p.527-530, 1994.
- HANSON, L. A. Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and of blood serum. **Int. Arch. Allergy**, v.18, p.241-267, 1961.
- HEREMANS, J.F. Immunoglobulin A. In: **The antigens** (M. Sela, ed.), v.2. New York, Academic Press, 1974. p.463-482.
- HEREMANS, J. F. *et al.* Isolation and description of the few properties of the β_2 A-globulin of human serum. **Clin. Chem. Acta.**, v.4, p.96-115, 1959.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **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.
- 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.1154-1158, 1954.

- KAGNOFF, M. F. Immunology and inflammation of the gastro intestinal tract. In: Sleisenger, M. H.; Fortdtran, J. S. **Gastrointestinal disease**. Philadelphia, 5th ed. W.B. Saunders Company, 1993. p.45-46.
- KAMINSKY, R. G. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *S. stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.79, n.2, p.177-280, 1993.
- KOGA, K. *et al.* A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, n.4, p.518-5 21, 1991.
- KUTTEH, W. H. *et al.* Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. **J. Immunol.**, 128: 990-995, 1982.
- LAMM, M. E. Celular aspects of immunoglobulin A. **Adv. Immunol.**, v.22, p.223-290, 1976.
- LAURIA- PIRES, L. Parasitoses intestinais. **Bras. Med.**, v.26, p.9-19, 1989.
- LEÃO, R. C. *et al.* Immunological study of human strongiloidiasis 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. Illinois: 1979. 477p. Cap.1: Introduction to the Nematoda. p.42-43.
- LINDO, J. F. *et al.* Prospective evaluation of ELISA and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *S. stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.51, n.2, p.175-179, 1994.

- LINDO, J. F. *et al.* Short report: long-term serum antibody esotype responses to *Strongyloides stercoralis* filariform antigens in eighth patients treated with ivermectin. **Am. J. Med. Hyg.**, v.55, n.5, p.474-476, 1996.
- LOWRY, V. H. *et al.* Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.29, p.265-275, 1951.
- 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, n.2, p. 156-161, 1998.
- MAHDI, N. K. *et al.* Diagnostic methods for intestinal parasites in Southern Iraque with reference to *Strongyloides stercoralis*. **J. Trop. Med. Public. Health.**, v.124, n.4, p.685-691, 1993.
- MESTECKY, J. *et al.* The human IgA system: A reassessment. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.40, p.105-114, 1986.
- MESTECKY, J. & MCGHEE, J. R. Immunoglobulin A (IgA): molecular and celular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. **Adv. Immunol.**, v.40, p.153-245, 1987.
- MILDER, J. E. *et al.* Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of United States. **Gastroenterol.**, v.80, n.6, p.1481- 1488, 1981.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Rev. Serv. Espec. Saúde Pública**, v.1, p.507-524, 1948.

- MUELLER, A. *et al.* *Strongyloides stercoralis* in a patient with AIDS and non-Hodgkin lymphoma. **DMW-Deutsche-Medizinische-Wochenschrift**, v. 123, n.13, p 381-385, 1998.
- MURTY, D. A. *et al.* Cytologic detection of *Strongyloides stercoralis* in a routine cervicovaginal smear. Case report. **Acta Cytol.**, v.39, n.2, p.223-225, 1994.
- NEVA, F. A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. **J. Infect. Dis.**, v.153, n.3, p.397-406, 1986.
- NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 9. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. Cap. 52: Exames parasitológicos de fezes. p.485-495.
- NOLETO, P. A. *et al.* Estrongiloidíase disseminada fatal: apresentação de 13 casos. **J. Bras. Med.**, v.59, n.1, p.59-69, 1990.
- PELLEGRINO, J. *et al.* Observações sobre reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* em pacientes com estrongiloidose. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.3, n.4, p.181-185, 1961.
- PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. Cap.46: Superfamília Rhabdisoidea-*Strongyloides stercoralis* e estrongiloidose. p.507-515
- PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v.48, n.4, p.175-182, 1993.

- ROITT, I. M. *et al.* **Imunologia**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap.4: Anticorpos e seus receptores. p.4.1-4.12.
- 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, n. 4, p. 361-365, 1993.
- RUBIN, W. *et al.* Immunofluorescent studies in adult celiac disease. **J. Clin. Invest.**, 44: 475-485, 1965.
- 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, n.1, p.51-52, 1996.
- SATO, Y. *et al.* Gelatin particule indiret agglutination test for examination for strongyloidiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.4 p.515- 518, 1991.
- SATO, Y. *et al.* Serodiagnosis of strongyloidiasis: the aplication and significance. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37, n.1, p.35-41, 1995a.
- SATO, Y. *et al.* Efficacy of stool examination for detection of strongyloidiasis infection. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, n.3, p.248-250, 1995b.

- SPIEGEL, N. R. **Estatística**. 3. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. Cap. 10: Teoria da decisão estatística, teste de hipóteses e significância, p.252-282.
- SUKHAVAT, K. *et al.* Comparative efficacy of four methods for the detection of *S. stercoralis* in human stool specimens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.88, n.1, p.95-96, 1994.
- TAKAYANAGUI, O. M. *et al.* Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Neurology**, v.45, n.1, p.193-194, 1995.
- TOMASI, T. B. JR. *et al.* Characteristics of Ancilost. immune system common to certain external secretions. **J. Exp. Med.**, v. 121, p. 101-124, 1965.

8. ANEXO**Termo de Consentimento**

Eu _____ Doc. nº _____
consinto na realização da colheita 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__.